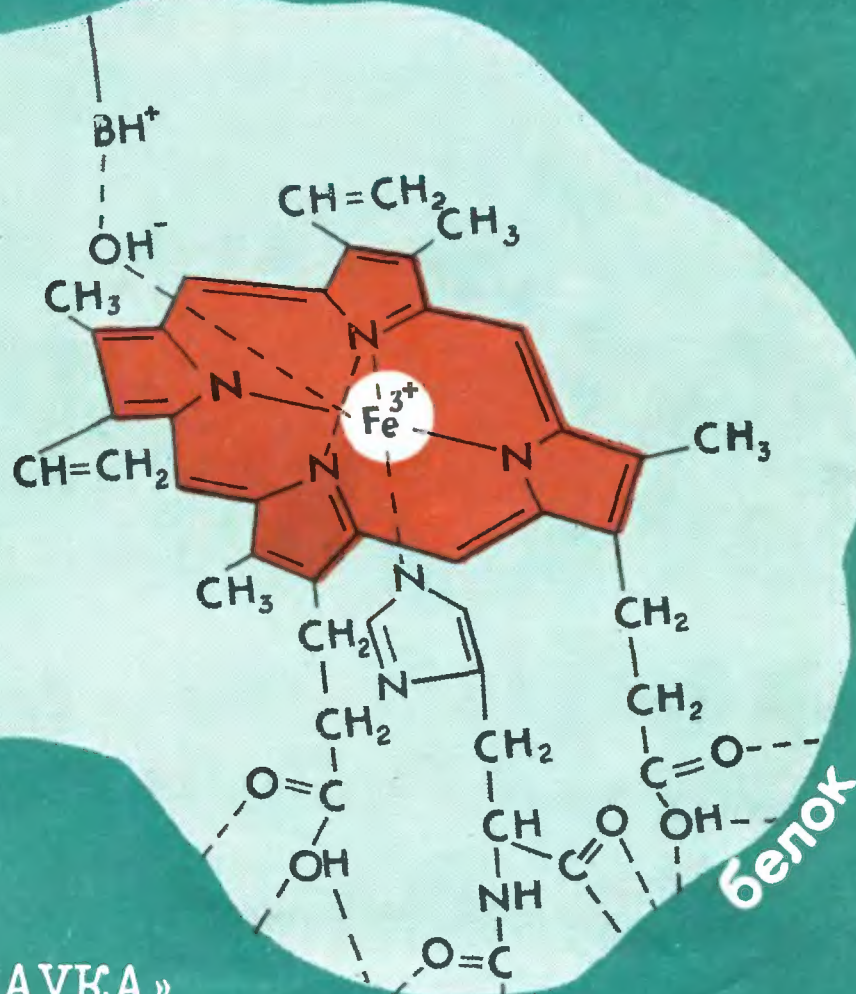


VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

ФЕРМЕНТ ПЕРОКСИДАЗА



«НАУКА»

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
Биолого-почвенный институт

В.А. Андреева

ФЕРМЕНТ ПЕРОКСИДАЗА

УЧАСТИЕ В ЗАЩИТНОМ
МЕХАНИЗМЕ РАСТЕНИЙ

Ответственный редактор
доктор биологических наук
Ю. Н. ЖУРАРЧЕВ



МОСКВА «НАУКА» 1988

Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений / В. А. Андреева.— М.: Наука, 1988.— 128 с.— ISBN 5-02-003944-6.

На основании обзора имеющихся литературных источников и собственных исследований автора приводится физико-химическая характеристика фермента пероксидазы (ПО) и его изоэнзимов. Обсуждаются особенности взаимодействия с субстратами и субстратная специфичность, взаимосвязь ПО с проявлением вирусного патогенеза и системной вирусиндуцированной устойчивости. Дается биохимическая характеристика изопероксидаз, выделенных из здоровых (контроль) и инфицированных (ВТМ, ХВК) растений-хозяев — картофеля, дурмана, табака. Рассматривается вопрос о возможности использования изоэнзимов этого фермента как маркеров в селекционной работе при выведении сортов растений, устойчивых к вирусным заболеваниям.

Книга рассчитана на биохимиков, физиологов, фитовирусологов, специалистов по защите растений.

Табл. 22. Ил. 22. Библиогр.: 444 назв.

Рецензенты:

Н. Н. Беседнова, Т. Н. Варвашевич, Е. А. Карпов

Научное издание

АНДРЕЕВА Вера Александровна

ФЕРМЕНТ ПЕРОКСИДАЗА

Участие в защитном механизме растений

*Утверждено к печати Биолого-почвенным институтом
Дальневосточного отделения АН СССР*

Редактор издательства И.А. Типисева

Художник С.А. Резников. Художественный редактор В.В. Алексеев

Технический редактор Г.И. Астахова. Корректор Г.В. Дубовицкая

ИБ № 37361

Подписано к печати 10.06.88. Т — 00156. Формат 60×90 1/16

Бумага книжно-журнальная, импортная

Гарнитура Литературная (фотонабор). Печать офсетная

Усл.печ.л. 8,0. Усл.кр.-отт. 8,5. Уч.-изд.л. 10,1. Тираж 1300 экз. Тип. зак. 1188
Цена 2 руб.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство "Наука"
117864 ГСП-7, Москва В-485, Профсоюзная ул., д. 90

2-я типография издательства "Наука"

121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6

А 2001040000-234
042(02)-88 217-88—III

© Издательство «Наука», 1988

ISBN 5-02-003944-6

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что основным требованием всего живого является поддержание молекул в восстановленном состоянии, и не малая роль в этих процессах принадлежит в первую очередь пероксидазам. Пероксидаза — один из весьма распространенных ферментных белков, интерес к изучению которого с годами не ослабевает. Повсеместное присутствие этого фермента в растительных и животных тканях, а также в составе метаболитов грибов и бактерий дает основание считать его жизненно важным соединением высших и низших организмов. Он является индуцибельным, реагирует на самые разнообразные воздействия, либо изменяя при этом набор своих изоэнзимов, либо повышая активность уже присутствующих молекулярных форм.

Пероксидаза — гликопротеид, для которого носителем соответствующей изменчивости могут быть углеводные компоненты. Такой компонент, даже небольшой по массе, может сообщать молекуле качественно новое состояние и регулировать отношение фермента к различным изменениям среды. Показано, что углеводная часть придает белку гораздо большую специфичность. Это своего рода векторные группы протеидов, которые «узнают» участки других структур, иные макромолекулы и поверхность клеток [Строев, 1986]. В связи с этим интересны данные, представленные Несселем и Мэдером [Nessel, Mäder, 1977], о том, что кислые пероксидазы, как биохимические соединения, занимают особое положение, а содержание углеводов у них достигает 20%.

Реакции, катализируемые пероксидазой, характеризуются переносом водорода от молекулы субстрата к перекисям, в результате чего возникают радикалы субстратов, являющиеся сильнореакционными соединениями. Большинство субстратов этого фермента — соединения фенольной природы. Окисляясь до хинонов, они обладают сильным окислительным действием. Фенолы могут также ковалентно связываться с молекулой пероксидазы, изменяя ее каталитическое действие [Srivastava, Huystee, 1977b]. Особенности строения молекулы и возможности ее изменения играют немаловажную роль при активации индивидуальных изоферментов. Несмотря на стремление автора собрать в монографии как можно больше данных по характеристике фермента пероксидазы, их нельзя считать полными, так как фермент сложен по набору своих изоэнзимов и по реакциям, осуществляемым с его участием.

О повышении активности пероксидазы в листьях растений табака, зараженных вирусом табачной мозаики, впервые было сказано Вудсом

еще в 1899 г. [Рубин, Зеленова, 1964]. Позднее установлено, что пероксидаза способна увеличивать бактерицидное действие фенолов в присутствии перекиси водорода и таким образом участвовать в защитном механизме [Kodjima, 1931]. Росс, заражая сверхчувствительные к вирусу табачной мозаики (ВТМ) растения табака, обнаружил проявление приобретенной устойчивости [Ross, 1961b], а затем было выяснено, что с этой устойчивостью коррелирует и повышение активности фермента пероксидазы.

В настоящее время накоплен значительный фактический материал об изменении активности изопероксидаз у растений, пораженных микроорганизмами. Взаимодействуя с клеткой растения-хозяина, патоген индуцирует в ней целую цепь реакций, причинно и функционально связанных друг с другом. Повышение окислительного обмена и активация пероксидазы — результат действия лишь одного из звеньев сложной цепи биохимических и физиологических процессов метаболизма. Ключевой вопрос, который встает при изучении фермента пероксидазы и его связи с защитным механизмом растений, — чем обусловлено повышение активности фермента? Синтезом ли изопероксидаз *de novo*? Изменениями ли конформации молекулы фермента, когда становятся более доступными реакционноспособные группы или активный центр? Присоединением ли определенных кофакторов или изменением содержания его субстратов?

Среди многих изучаемых ферментов только пероксидаза повышает свою активность в течение длительного времени в тканях между некрозами, а также в выше- и нижележащих листьях (по отношению к инфицированному) у сверхчувствительных растений табака [Simons, Ross, 1970, 1971]. Как механизм реакций сверхчувствительности (некроз), так и устойчивость, индуцированная вирусами в листьях, расположенных на расстоянии от мест проникновения патогенов, привлекают многих исследователей. С годами интерес к проблеме иммунных реакций растений не ослабевает, а, наоборот, по мере накопления знаний все возрастает. По данным Вестштейна [Weststeijn, 1976], устойчивость, индуцируемая вирусом, обусловлена «агентом» белковой природы, параллельно с передвижением которого от мест проникновения вируса к другим клеткам и тканям повышается активность фермента пероксидазы в них.

Выяснение индуцированного повышения активности пероксидазы при различных нарушениях метаболизма представляет несомненный интерес, так как не выяснены временная сущность возрастания активности при патогенозе и тонкий химизм этих процессов. Некоторые авторы, исследуя растения, зараженные вирусами и поврежденные механически, считают, что активирование пероксидазы при этом носит неспецифический характер [Birecka et al., 1975]. Однако данные этих авторов не имеют достаточных доказательств, их исследования вызывают ряд вопросов. Кажущаяся однотипность ответных реакций растительного организма на различные физиолого-биохимические нарушения в каждом отдельном случае сохраняет черты определенной индивидуальности и специфичности. Непосредственный контакт хозяина и вируса приводит к возникновению качественно новой системы, которая представляет собой не простую сумму объединенных свойств и геномов каждого из партнеров, а является результатом очень сложного, весьма специфического взаимодей-

ствия, резко отличающегося от любого другого нарушения метаболизма. Если бы ответные реакции растений на различные повреждения были неспецифичны в самой своей основе, то абсолютная однотипность биохимических процессов при них давно бы стала очевидной.

Жизнедеятельность любого организма основана на ферментативных процессах, и очень важно знать, как функционируют ферментные системы в зараженном организме, каковы последовательная цепь и механизм защитного ответа. В растениях, так же как у животных, интеграция биохимических процессов осуществляется на уровне отдельной клетки, органа или целого организма. Для координации отдельных функций в клетках растений существуют механизмы, посредством которых они могут взаимодействовать между собой. Большую роль в объединении растительных клеток играет гормональная система, а также молекулы-посредники. Остается лишь выяснить, как осуществляется ход реакций, обеспечивающих передачу сигналов на значительные расстояния при заражении растений. Чем больше удастся понять о взаимодействиях хозяин—патоген на биохимическом уровне и выявить последовательность реакций в их динамике и сложности, тем раньше окажется возможным манипулировать этими реакциями для повышения резистентности растений.

Согласно собственным исследованиям автора и анализу литературных источников, стало вполне очевидным, что изменения метаболизма, вызываемые вирусами, специфичны для растений-хозяина. Под влиянием вируса происходит как ингибирование, так и индуцирование синтеза «новых» изоэнзимов пероксидаз. Но так как фермент в клетках растений представлен большим набором изоэнзимов (от 3 до 42 молекулярных форм) с широким диапазоном ферментативной деятельности, в пределах рН от 3 до 14, то изучение этого фермента весьма сложно. Сведений о каталитической активности каждого из изоэнзимов пероксидазы в реакциях метаболизма разных растительных организмов весьма недостаточно. Тем более практически нет таких сведений об изменении каталитических свойств индивидуальных изопероксидаз в вирусных растениях. Физико-химическая характеристика пероксидаз, выделенных из зараженных вирусами и контрольных растений табака, свидетельствует об определенных различиях между ними [Воронова и др., 1981]. Применение хроматографических методов исследований позволило выделить два белка с пероксидазной активностью и изучить некоторые каталитические свойства их в опыте и контроле [Андреева и др., 1979; Андреева, 1981]. Это дало возможность получить новую информацию об активности изопероксидаз вирусных растений.

Из работ, вышедших за последнее время, наибольшее внимание заслуживает коллективный труд авторов «Биохимия иммунитета, покоя, старения растений» [1984], выполненный в Институте биохимии им. А. Н. Баха. Изучая различные стороны метаболизма растений, пораженных грибными заболеваниями, авторы дают анализ различных биотических индукторов защитных реакций растений и возможные пути их практического использования. Однако в нем не проанализированы сведения о биохимии защитных реакций растений, зараженных вирусами. Взаимодействие растений-хозяев и вирусов, их поражающих, происходит иначе, чем при заражении грибами и бактериями, так как у вирусов нет

собственной ферментной системы. Вирус индуцирует в клетках растений процессы, полностью зависящие от метаболических путей хозяина. К тому же один и тот же вирус может вызывать различную реакцию у разных хозяев, а разные вирусы — неидентичные реакции у одного и того же хозяина. В настоящее время мы имеем, как правило, разрозненный материал, полученный на растениях-хозяевах в различные сроки заражения и взятия проб для эксперимента. Исследователи выделяют отдельные метаболические реакции и на их основе пытаются понять взаимодействие вирус—растение. Очевидно, совершенно необходимо проводить исследования на одном растении-хозяине, поражаемом как вирусным, так и грибным заболеванием, в целях четкого понимания общих закономерностей и определенных различий в путях иммунных процессов инфицированных растений.

Современная сельскохозяйственная практика (посев семенами одного сорта на больших площадях, применение фунгицидов, инсектицидов и т. д.) способствует возникновению новых рас патогенов, которые могут в сильной степени поражать ранее устойчивые сорта растений. Если в прежние годы сорта могли сохраняться 2—3 десятилетия, то теперь устойчивость к возбудителям теряется уже через 5—7 лет [Конарев, 1985]. В условиях промышленного возделывания растений из природной популяции могут выделяться и накапливаться сильновирulentные штаммы вирусов, поражающие постоянно высеваемые культуры. Все это определяет необходимость глубокого изучения биохимических основ механизмов фитоиммунитета, а полученные теоретические разработки более эффективно использовать для приемов борьбы и защиты растений от патогенов.

Автор выражает искреннюю признательность сотрудникам Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО АН СССР кандидатам химических наук Олегу Борисовичу Максимову, Раисе Петровне Горшковой и Нине Арвидовне Василевской за консультацию и помощь в выполнении работ по определению углеводов и фенольных соединений, а также Светлане Ильиничне Омельченко, принимавшей активное участие в проведении совместных исследований.

ГЛАВА I

ПЕРОКСИДАЗА — ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЙ

1.1. ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТА

Проявление пероксидазной функции у биологических объектов было замечено еще в прошлом веке, на заре изучения органических веществ. Самое раннее сообщение о пероксидазе появилось в 1855 г., после того как Шенбейн провел окисление ряда органических соединений разбавленными растворами перекиси в присутствии экстрактов из растений и животных [Saunders et al., 1961]. Название «пероксидаза» дал Линозье ферменту, выделенному им из гноя лизированных лейкоцитов и катализирующему окисление разных соединений за счет перекисного кислорода (Linossier, 1898, цит. [Михлин, 1947]). Линозье первым привел различия между «оксидазами» и «пероксидазами». Как пишет Д. М. Михлин, выделением пероксидазы в сравнительно чистом виде и изучением основных ее свойств мы обязаны Алексею Николаевичу Баху и его сотрудникам. В 1903 г. они выделили пероксидазу, относительно свободную от других ферментов (в том числе от каталазы), чем было окончательно опровергнуто долгое время господствовавшее мнение о тождественности пероксидазы и каталазы.

А. Н. Бах и Р. Шода для оценки активности растительной пероксидазы использовали окисление пирогаллола до окрашенного пурпурогаллина (Bach, Shodat, 1903, цит. по: [Роговин и др., 1977]). Они нашли, что скорость образования пурпурогаллина пропорциональна концентрации фермента и перекиси водорода. Этим методом пользуются биохимики и поныне для оценки активности как растительных, так и животных пероксидаз. В дальнейших исследованиях были определены оптимум действия пероксидазы, температурная зависимость, оптимум концентрации водородных ионов, установлено также значение концентрации субстрата в реакциях с ферментом и т. д. Для уровня исследований тех лет это было значительным шагом вперед в области изучения белков-ферментов растений. Именно тогда А. Н. Бахом была высказана гипотеза об участии перекисей в окислении органических соединений.

С годами интерес к ферменту пероксидазе не ослабевал. В 30—50-е годы внимание многих исследователей было приковано к таким геминным белкам, как пероксидаза, каталаза, цитохромы и гемоглобин. Подтверждением тому служит работа Д. М. Михлина «Пероксиды и пероксидазы», вышедшая в 1947 г. В 60—70-е годы большое внимание уделялось пероксидазам больного растения на кафедре физиологии

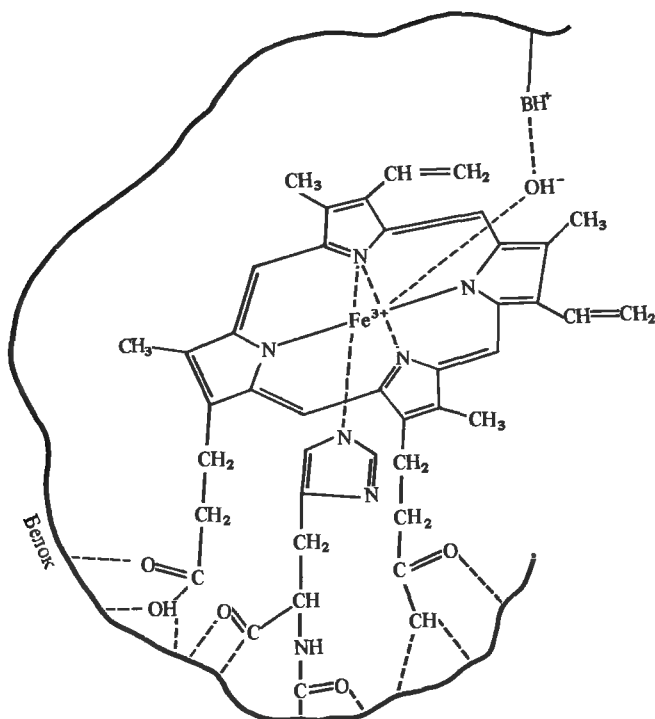
растений МГУ членом-корреспондентом ВАСХНИЛ Б. А. Рубиным и его сотрудниками. В 80-е годы на кафедре химической энзимологии МГУ, возглавляемой членом-корреспондентом АН СССР И. В. Березиным, успешно велось изучение каталитических свойств пероксидазы, выделенной из растений хрена. Согласно сводке литературы, представленной швейцарскими и канадскими исследователями, только с 1970 по 1980 г. вышло из печати 1600 научных статей [Gaspar et al., 1982], посвященных этому ферменту. В них освещены различные стороны физико-химического строения, биологического действия и участия в метаболических процессах пероксидаз, в основном растительного происхождения. Представленный авторами список работ не является полным, так как не были учтены работы, касающиеся пероксидаз микро- и макроорганизмов.

Повышенное внимание к этому ферменту прежде всего вызвано тем, что до сих пор остается невыясненным наличие большого набора изоэнзимов (от 3 до 42) у многих исследуемых растительных пероксидаз. Скандалиоз считает пероксидазы «семейством» ферментов со сходными физиолого-биохимическими свойствами, где многое еще необходимо выяснить [Scandalios, 1969]. Другой, не менее интересный вопрос заключается в широкой субстратной специфичности или, в узком понимании этого определения, в отсутствии таковой для пероксидаз. Установлено, что пероксидазы неспецифичны в отношении доноров водорода, но строго специфичны в отношении второго субстрата — перекиси водорода при проявлении пероксидазной функции фермента. Возможное участие пероксидаз в защитных реакциях или в других проявлениях патогенеза также способствует сохранению постоянного внимания исследователей к этому ферменту.

1.2. ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ МОЛЕКУЛЫ

Пероксидаза — двухкомпонентный фермент, представляющий собой сочетание активной группы, вступающей в химическое взаимодействие с субстратами, и коллоидального белкового «носителя», усиливающего каталитическое действие этой группы. Это глобулярный белок диаметром 50 Å [Clementi, Palade, 1969], который содержит около 43% α -спиральных участков в составе белковой части молекулы [Strickland, 1968]. По номенклатуре ферментов, принятой на Международном биохимическом съезде в 1979 г., пероксидаза — фермент, действующий на перекись водорода в качестве акцептора. Единственный подподкласс (1.11.1) составляют пероксидазы, где под кодовым номером семь стоит истинная пероксидаза — донор: H_2O_2 -оксидоредуктаза (КФ 1.11.1.7), о каталитическом действии которой более подробно будет сказано ниже.

Изученные до настоящего времени пероксидазы состоят из неокрашенного гликопротеина и соединенного с ним коричнево-красного феррипорфирина. Геминная часть молекулы (гем, гемин) — железопроtopорфирин IX представлен на рис. 1. Выполняя роль активного центра, он участвует в разложении или активации перекиси водорода, в результате чего возникают радикалы соответствующих субстратов [Reppeneberg



Р и с. 1. Схема строения гема и его связи с апоферментом в пероксидазе

et al., 1981]. Простетическая группа пероксидаз хрена и японской редиски, цитохрома *c*, хлоропероксидазы известна как феррипротопорфирин IX. Полагают, что все известные пероксидазы и их изоформы содержат этот гем, поскольку они ингибируются азидом и цианидом.



Феррипротопорфирин IX входит в активный центр, составляя порфириновое кольцо гема, являющегося высокоароматичным и гидрофобным соединением. Именно гидрофобное взаимодействие порфиринового макроцикла с белком формирует третичную структуру нативной пероксидазы. Известно, что протопорфирин оказывает важное стабилизирующее влияние на белковую глобулу гемсодержащих ферментов. Так, комплексообразование апопероксидазы хрена с гемом резко повышает устойчивость белка к действию ультрафиолета и тепла. Удаление простетической

группы фермента ведет к потере пероксидазной активности, но не называется на ее оксидазной функции [Siegel, Galston, 1967a].

Хилл и Холден в 1926 г. впервые добились успеха в расщеплении молекулы пероксидазы на простетическую группу и протеин, применяя обработку соляной кислотой и ацетоном [Maehly, 1952]. Маэли [Maehly, 1952], используя различные приемы щелочного и кислотного гидролиза гем-протеиновой связи, показал, что при нейтрализации щелочью HCl-расщепляющего раствора в присутствии подходящего буфера происходит рекомбинация протогемина и протеина в активную пероксидазу. И эта обратимая реакция может быть повторена несколько раз с тем же энзимом без заметных потерь активности. Автор также отметил, что белок пероксидазы хрена устойчив при щелочном pH, а цвет гема при этом меняется от коричневого до красного.

Эти сведения интересны в том плане, что гемин входит в состав многих весьма важных биологических молекул, образуя связь с различными по строению белками. Известно также, что гемин стабилизирует белковую глобулу гемсодержащих ферментов, и не только пероксидазы, но и каталазы, цитохрома P-450, гемоглобина, миоглобина. Для пероксидазы хрена с молекулярной массой 44 кДа гематин составляет 1,48% этого веса. Лобаржевский [Lobarzewski, 1977] определил процентное содержание гематина для двух грибных (*Junotus radiatus*) пероксидаз, соответственно для пероксидазы Ia — 1,09% и пероксидазы IIa — 1,15%. Свободный гем (не связанный с белком) обладает рядом свойств, присущих гемсодержащим белкам: способностью к комплексообразованию с различными лигандами, к реакциям электронного переноса, к катализу окислительно-восстановительных реакций.

Связь гема с белковой частью молекулы пероксидазы хрена и кинетика этого взаимодействия подробно изучены в работах, проводимых на кафедре химической энзимологии МГУ [Березин и др., 1974, 1975а, б; Угарова и др., 1977; Угарова, Лебедева, 1978; Ugarova et al., 1984]. Авторы показали, что комплексообразование апопероксидазы с геминном и протопорфирином заметно изменяет третичную структуру белка, что проявляется, в частности, и в наблюдаемых различиях рК ионогенных групп, ответственных за поддержание стабильной конформации белковой глобулы пероксидазы хрена. Некоторые различия в третичной структуре белка вокруг гема были показаны для кислых и основных пероксидаз хрена и редьки. Методом кругового дихроизма исследованы конформационные различия между пероксидазами хрена и репы, и высказано предположение, что активные участки их подобны по строению, а сами пероксидазы различаются по аминокислотному и карбогидратному составу [Gaspar et al., 1982].

1.3. ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА

Первичную структуру пероксидазы хрена стали изучать сравнительно давно [Paul et al., 1953; Shappon et al., 1966; Paul, Stigbrand, 1970]. Шэннон с соавт. разделили пероксидазу из корней хрена на пять отдельных фракций: A₁, A₂, A₃, B и C. Выделенные фракции были гидролизованы и разделены хроматографически на индивидуальные аминокислоты.

Авторы установили, что белковая часть этих пероксидаз состоит из 18 аминокислот. Пероксидазы А₁, А₂, А₃ имеют в своем составе оксипролин, а фракции В и С оксипролин не содержат. Возможности методов тех лет не позволили провести более тщательную очистку и разделение, но, несмотря на это, полученные данные вызвали несомненный интерес, так как давали представление о существенных различиях между пероксидазами одного и того же исходного материала. Авторы показали, что А-пероксидазы содержат значительно больше ароматических аминокислот, чем пероксидазы В и С. Различаются они также и по некоторым физико-химическим свойствам. Все изопероксидазы растений хрена имеют одну полипептидную цепь, но отличаются по первичной структуре белковой молекулы [Ship et al., 1971]. Авторы установили, что изопероксидазы хрена имеют по шесть полуцистеиновых остатков в каждом изоэнзиме, которые составляют по три дисульфидные связи, и что в нативной пероксидазе нет свободных SH-групп.

Изучение первичной структуры пероксидазы хрена провели также Велиндер и сотр. [Welinder et al., 1972]. Они выяснили, что в состав первичной структуры белка может входить от 203 до 300 аминокислотных остатков. Ими же определены N- и C-концевые аминокислоты для исследуемых пероксидаз.

В 1981 г. вышла работа японских исследователей, которые выделили, очистили и закристаллизовали шесть щелочных изоэнзимов пероксидазы хрена [Aibaga et al., 1981]. По количеству аминокислотных остатков (от 296 до 318) и соотношению углеводных компонентов все шесть изоэнзимов заметно различались между собой. Было установлено, что из шести изопероксидаз четыре (Е₃—Е₆) имели экстремально высокие значения рН изоэлектрической точки (выше 12) и сравнительно низкое содержание углеводов — всего от 0,8 до 4,2%. Изоэнзимы Е₁ и Е₂ содержали 12,0 и 14,1% углеводов и имели изоэлектрическую точку — 10,6.

В составе углеводной части молекулы пероксидазы хрена идентифицированы нейтральные и аминоксахара в количестве до 20 % общего веса [Shannon et al., 1966]. Среди них идентифицированы галактоза, глюкоза, манноза, арабиноза, ксилоза, фруктоза и гексозамин [Klapper, Hackett, 1965]. Установлено, что молекулы сахаров могут присоединяться только к пяти аминокислотным остаткам из тех двадцати, которые входят в состав полипептидной цепи [Sharon, 1974]. Для многих гликопротеинов показано, что первое звено полисахарида (ацетилгалактозамин) присоединяется к аспарагину.

Различия в первичной структуре по качественному и количественному составу аминокислот и сахаров были найдены для пероксидаз самых различных растений [Mazza et al., 1973; Tyson et al., 1978; Mäder, 1980; Kim et al., 1980; Vandenberg, Vanhuystee, 1984; Floris et al., 1984]. Следует отметить, что среди изоэнзимов пероксидазы есть и такие, которые не содержат углеводных компонентов. Так, из культуры ткани табака W-38 и суспендиальной культуры табака WR-132 были выделены две анодные (А₁ и А₂) и две катодные (С₃ и С₄) изопероксидазы, и оказалось, что изоэнзим С₄ содержал углеводные остатки [Powell et al., 1975].

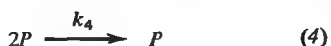
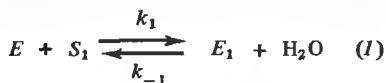
Роль углеводных компонентов в молекуле пероксидазы пока до конца

не выяснена, так как отщепление некоторых углеводов не приводило к изменению ферментативной активности. Так, удаление глюкозы или галактозы из молекулы пероксидазы не снижало активности, но повышало устойчивость к протеолитическим ферментам [Tadors et al., 1982, 1983]. Авторы предполагают, что углеводы облегчают прохождение пероксидазы через мембрану и стабилизируют трехмерную структуру апофермента. Как показали Н. Н. Угарова и др. [Ugarova et al., 1984], конформационная упаковка пероксидазы хрена такова, что только немногие участки функциональных групп белковой части располагаются близко к поверхности молекулы и доступны для модификации. Большинство же этих групп так или иначе удалены от края, защищены карбогидратными остатками и, следовательно, недоступны. Такая структурная организация пероксидазы, очевидно, и обуславливает определенные особенности каталитического акта.

1.4. КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Основная функция пероксидазы — катализировать окисление химических соединений за счет кислорода перекиси с образованием промежуточных комплексов, обладающих различными спектральными характеристиками. К настоящему времени обнаружено четыре типа комплексов. Комплекс I образуется сразу при добавлении H_2O_2 и обычно быстро превращается в комплекс II; комплексы III и IV представляют собой соединения, появляющиеся при избытке перекиси. Комплексы III и IV не обладают каталитической активностью, их образование ведет к торможению реакции.

Классическими работами по изучению этого вопроса являются работы Теорелля и Чанса [Theorell, 1942; Chance, 1949, 1954], которые показали существование промежуточных соединений фермента с субстратом. Спектрофотометрически Чансу удалось различить четыре промежуточных соединения фермента с субстратом, из которых хорошо изучены только два (I и II). Превращение комплекса I в комплекс II протекает быстрее в присутствии донора водорода, например полифенолов. Общая схема действия пероксидазы была предложена Чансом:



Здесь E — нативный фермент, E_1 и E_2 — промежуточное соединение I и II, S_1 и S_2 — перекись водорода и донор водорода соответственно, k — константа скорости реакции, P — продукт реакции. Реакции (2) и (3) являются процессами одноэлектронного восстановления промежу-

точных окисленных форм E_1 и E_2 ; E_1 обладает двумя дополнительными окислительными эквивалентами по сравнению с нативным ферментом, а E_2 — одним [Угарова, Лебедева, 1978].

Согласно исследованиям Фромма [Fromm, 1967], механизм действия пероксидазы напоминает реакции для трех субстратов по типу «пинг-понг», где фенолы — два независимых субстрата, а перекись водорода является третьим субстратом. В результате такого типа реакций образуются свободные радикалы. Феноксильные радикалы могут появляться на двух отдельных стадиях катализа [Wilson, Wong, 1976] и объединяться в димеры. Как указывают Диннер и др. [Danner et al., 1973], радикалы не могут находиться в равновесии в свободном состоянии, так как тогда бы они давали такие смеси продуктов, как, например, *о-о*-дифенол, *п-п*-дифенол и *о-п*-дифенол. Но в этих случаях присутствует только один продукт ферментативной реакции, а именно *о-о*-дифенол, и это свидетельствует о том, что радикалы соединяются с белком пероксидазы. Полученные данные подтверждают мнение, что каталитический акт происходит и на поверхности белка, причем фенолы усиливают эффект модификации молекулы фермента [Fox, Purves, 1968; Ugarova et al., 1984].

Чанс и Фредович высказали предположение, что субстраты пероксидазы можно разделить на два группы. Субстраты первой группы (к ним относятся в основном неорганические ионы — ферроцианид, йодид, нитрит и т. д.) взаимодействуют непосредственно с гемом. Субстраты второй группы (ароматические амины и фенолы) непосредственно с гемом не реагируют. Следовательно, должна существовать некая электрон-транспортная цепь, включающая функциональные группы белковой части молекулы. Различия между субстратами проявляются в разной зависимости от pH при взаимодействии с промежуточными соединениями E_1 и E_2 и в чувствительности субстратов к действию активаторов [Лебедева и др., 1977; Kabayashi et al., 1986]. Геометрию комплексов пероксидазы хрена с ароматическими субстратами дают в своей статье А. М. Качурин и В. Н. Фомичев [1982].

Присутствующий в пероксидазе единственный ион железа обладает способностью не только активировать перекись водорода, но и сообщать ей способность вступать в реакции окисления различных субстратов. Источником активного кислорода при каталитическом действии пероксидазы могут служить также и органические перекиси, в том числе и перекиси ненасыщенных жирных кислот и каротина. К субстратам, окисляемым пероксидазой в присутствии перекиси, можно отнести большинство фенолов (пирокатехин, пирогаллол, гидрохинон, резорцин, гваякол), а также бензидин, адреиналин, анилин, *п*-толуидин, ароматические кислоты (бензойную, салициловую, галловую), аскорбиновую кислоту, нитриты и ряд других соединений.

Установлено, что фермент обладает не только пероксидазными, но и оксидазными свойствами, катализируя окисление целого ряда соединений за счет неактивированного молекулярного кислорода. Наличие у пероксидазы двух различных функций уже не вызывает сомнений, однако нет однозначного ответа на вопрос о том, один или два активных центра присутствуют в молекуле пероксидазы. Это объясняется недостаточным

количеством данных о деталях структуры фермента и его молекулярной неоднородностью.

Приоритет в открытии оксидазной функции принадлежит Теореллу [Swedin, Theorell, 1940]. В некоторых растениях он обнаружил фермент, окисляющий дигидроксифумаровую кислоту (ДГФ) с поглощением кислорода, и доказал, что этот фермент — пероксидаза. Оксидазная функция фермента проявляется во взаимодействии с соединениями различной химической природы: флороглюцином, дигидроксифумаратом, индолилацетатом, гидро- и нафтогидрохинонами, глутатионом и рядом других веществ [Иванова, Рубин, 1962, 1963; Рубин, 1966; Klapper, Hackett, 1963; Yamazaki, Piette, 1963; Kay et al., 1967]. Необходимым условием оксидазной реакции является наличие кофакторов-ионов марганца и различных фенольных соединений.

Пероксидазная и оксидазная активность была проверена с пероксидазой, выделенной из земляного ореха [Chibbar, Huystee, 1984]. Исследователи установили, что удаление гема практически не меняет размера молекулы, но приводит к полной потере пероксидазной активности. При этом оксидазная активность фермента снизилась только на 20%. После реконструирования (объединение гема с апоферментом) активность составляла лишь 50% активности нативного энзима. Субстратами для проявления оксидазной функции пероксидазы могут быть гидро-, нафтохиноны, индолилуксусная кислота, восстановленные коэнзимы $\text{NAD} \cdot \text{H}_2$ и $\text{NADP} \cdot \text{H}_2$ [Klapper, Hackett, 1965; Srivastava, Huystee, 1977a]. Проводились также исследования по изучению условий окисления NAD и $\text{NAD} \cdot \text{H}$ пероксидазами, выделенными из растений хрена [Avigliano et al., 1985].

Особый интерес представляет способность пероксидазы окислять предварительно окисленным триметафенол-флороглюцином [Yamazaki, Piette, 1963; Рубин, Логинова, 1973; Иванова и др., 1966, 1970] такие биологически важные соединения, как $\text{NAD} \cdot \text{H}_2$ и $\text{NADP} \cdot \text{H}_2$. Это свойство фермента свидетельствует о принципиальной возможности участия пероксидазы в нормальном дыхании клетки путем активации кислорода воздуха для окисления обычных субстратов дыхания — метаболитов цикла Кребса [Воронков, 1967; Kay et al., 1967].

В работе Шэннона с соавт. [Shannon et al., 1966] имеются данные о каталитических свойствах семи изоэнзимов пероксидазы из корней хрена. При использовании в качестве субстрата *o*-дианизидина (пероксидазная функция) установлено, что более активны были анодные изоэнзимы, тогда как при проверке со щавелевой кислотой (оксидазная функция) более высокую активность проявляли катодные изоэнзимы. Т. М. Иванова, Б. А. Рубин [1962] провели сравнительное изучение двух препаратов фермента, применив в качестве субстрата флороглюцин. Оказалось, что оксидазная активность пероксидазы пропорциональна ее пероксидазной активности. Исходя из полученных результатов, авторы высказали предположение, что активный центр фермента, ответственный за окисление как неактивированным (молекулярным), так и активированным (перекисным) кислородом, один и тот же. К такому же выводу пришли и другие исследователи [Попов, 1965; Walker, Kilgour, 1965; Иванова и др., 1967; Harada, Wada, 1968; Пейве и др., 1972].

Однако в других работах приводятся данные о существовании двух различных центров ферментативной активности пероксидазы [Siegel, Galston, 1967a, b; Рамазанова и др., 1971]. Интересные результаты по этому вопросу получены при окислении пероксидазой индолилуксусной кислоты [Siegel, Galston, 1967a; Alghisi et al., 1971]. Апофермент пероксидазы хрена после удаления геминовой группы был лишен пероксидазной активности (субстраты — пирогаллол, бензидин, гваякол), но сохранял оксидазную активность в присутствии индолилуксусной кислоты (ИУК). После рекомбинации апофермента с гемом восстанавливалась только 1/40 пероксидазной активности, тогда как оксидазную активность фермент сохранял полностью. Поскольку рекомбинация апофермента с гемом не изменяет оксидазной активности пероксидазы, указанные авторы высказали предположение о существовании двух различных активных центров фермента.

Л. Х. Рамазанова с соавт. [1971] исследовали влияние некоторых ингибиторов на гемин и белковую часть фермента пероксидазы и показали что цианид и кипячение больше ингибировали пероксидазную активность, а азид и диметилформальдегид — флороглүциноксидазную. Эти исследователи допускают присутствие в молекуле фермента наряду с пероксидазным и оксидазного активного центра. Очевидно, пока нет оснований полностью отрицать предположение указанных авторов.

О механизме проявления ИУК-оксидазной активности и о роли в этом процессе карбоксильных и аминогрупп пероксидазы, выделенной из трех различных объектов, пишут польские исследователи [Lobazewski, Wolski, 1985]. Оказалось, что если «пришивка» фермента к матриксу осуществлялась по свободным аминогруппам, то ИУК-оксидазная активность у пероксидазы отсутствовала. Иммобилизация фермента через карбоксильные группы приводила к полному восстановлению этой активности. Поскольку в обоих случаях с матриксом связывали одинаковое количество пероксидазы, то потеря пероксидазой ИУК-оксидазной активности означала, что для протекания реакции окисления ИУК в активном центре пероксидазы необходимо присутствие свободных карбоксильных групп, которые *in vivo* могут связываться с аминными группами белка фермента.

Показана роль пероксидазы в проявлении оксигеназной функции, свойственной рибүлозодифосфаткарбоксилазе / оксигеназе у высших растений [Demirevska-Kepova, Vassileva, 1985]. Пероксидазы из корней ячменя и ложницы, кроме пероксидазных и оксидазных свойств, выражали и оксигеназные, но для реакции был необходим ион меди. Для проявления каталитической активности пероксидазы в некоторых реакциях совершенно необходимы кофакторы. В роли кофакторов для этого фермента могут быть ионы таких металлов, как Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} и др., или сложные органические соединения, вступающие во временное взаимодействие с молекулой пероксидазы.

Изложенное выше свидетельствует о том, что пероксидаза, проявляя различную ферментативную активность, может быть отнесена к числу регуляторных ферментов. К тому же она способна изменять активность путем ковалентной или ионной модификации своих специфических функциональных групп, необходимых для более полного выражения каталитической эффективности фермента. К их числу относятся три карбоксиль-

ные группы нативного белка пероксидазы, которые участвуют в окислении *o*-дианизидина [Ugarova et al., 1984]. Н. Н. Угарова и О. В. Лебедева [1978] пишут, что динамическая структура активного центра фермента, полуфункциональность групп активного центра, высокие потенциальные возможности реализации нескольких путей электронного транспорта в пероксидазе являются теми основными факторами, которые, по-видимому, и обеспечивают эффективное выполнение ею физиологических функций. Регулирование пероксидазной активности с помощью pH, ингибиторов и активаторов позволяет как бы сузить субстратную специфичность фермента, сделать более эффективным одно необходимое превращение из большого числа возможных реакций.

1.5. СРОДСТВО К СУБСТРАТАМ

Весьма широкая специфичность пероксидазы к субстратам различной природы вызывает самый пристальный интерес. В настоящее время почти отсутствуют исследования, в которых приводился бы достаточно полный анализ избирательности изоэнзимов этого фермента по отношению к стереохимическому расположению окисляемых субстратов. В реакциях взаимодействия фермента и субстрата молекула субстрата должна иметь две структурные особенности: 1) специфическую химическую связь, которую фермент мог бы атаковать; 2) функциональную группу, ориентирующую молекулу субстрата в активном центре так, чтобы атакуемая связь субстрата была правильно расположена по отношению к каталитическому центру фермента. Так, для многих ферментов лимитирующей стадией реакции является изменение конформации белка, индуцируемое субстратом, коферментом или эффектором [Гольдштейн и др., 1974].

Скорость образования соединений фермент—субстрат очень велика, и активность фермента лимитируется скоростью распада этого комплекса — константой Михаэлиса—Ментен K_m . Однако величина K_m может меняться в зависимости от того, какой изоэнзим катализирует данную реакцию. Так, Гибсон и Ли проверили два выделенных изоэнзима пероксидазы проростков гороха с искусственными (*o*-дианизидин и бензидин) и естественными (эугенол, кофейная и феруловая кислоты) субстратами и показали, что величина K_m различается для изоэнзимов этой пероксидазы в зависимости от использования того или иного субстрата. Исследуя изоэнзимный состав пероксидазы в динамике развития проростков гороха с этими пятью субстратами, они установили, что в опытах с кофейной кислотой наибольший пик активности наблюдается на 7-й день после проращивания семян. Методом электрофореза был выявлен изофермент, ответственный за эту реакцию, и выяснено, что он не реагировал с другими субстратами [Gibson, Liu, 1978].

Величина K_m зависит от типа субстрата, pH реакционной смеси и температуры. Если фермент катализирует превращения нескольких близких субстратов, то каждому субстрату соответствует собственная величина K_m . В первом приближении реакция катализа протекает тем быстрее, чем ниже K_m . Величина K_m суммарной пероксидазы хрена была

дана для сравнительно большого количества субстратов [Brignac, Tien-
huc Yc, 1975]. Так, значение $K_m \times 10^{-5}$ М для *n*-гидроксифенилуксусной
кислоты равно 500, а для *m*-крезола эта величина равна всего лишь 1, что
свидетельствует о различном сродстве изопероксидаз к этим фенольным
соединениям.

Лобаржевский [Lobarzewski, 1981] определил K_m пероксидазы хрена
для 16 различных субстратов и показал различия между ними. Совместно
с Трояновским он установил K_m для распространенных субстратов
с пероксидазой, выделенной из гриба (*Gramotes versicolor*), и выяснил,
что K_m грибной пероксидазы по отношению к *n*-фенилендиамину рав-
няется 10,0, а для *o*-дианизида — $0,006 \text{ M}^{-1}$, т. е. у последнего субстра-
та сродство к ферменту гораздо выше [Lobarzewski, Trojanowski, 1979].
Высказано предположение, что механизм пероксидазного катализа раз-
личен в реакциях с разными субстратами. Так, феррицианид калия
вступает в реакцию непосредственно с гемом, а *o*-дианизидин взаимо-
действует с функциональными карбоксильными группами белка молекулы
фермента [Лебедева и др., 1981].

Интересные исследования были проведены Галстоном с сотрудни-
ками. Они нашли, что индивидуальные изопероксидазы с различной
скоростью окисляют все множество свойственных им субстратов, но
не все множество изоформ фермента присутствует в растении постоянно
[Siegel, Galston, 1967 a, b]. Установлено также, что у филогенетически
разных растений пероксидазы различаются по проявлению сродства
к таким субстратам, как бензидин, гваякол и пирогаллол [Georgiew et al.,
1977]. Субстраты с наибольшим сродством к ферменту, дающие окра-
шенные продукты деятельности изопероксидаз (бензидин, его произ-
водное *o*-дианизидин и гваякол), чаще других используются для выявле-
ния различных изоэнзимов. Перечень субстратов, указанных в цити-
руемых работах, дает некоторые представления о широте специфического
действия пероксидазы. С этой же целью можно рекомендовать обзор,
в котором рассматриваются пероксидазы растительного и животного
происхождения, а также кинетика их взаимодействия с субстратами
различной природы [Dunford, Stillman, 1976].

Итак, пероксидаза является гемсодержащим гликопротеидом. Ката-
литические свойства его строго специфичны к перекиси водорода, но этот
фермент проявляет широкую специфичность к другим, весьма разно-
образным по строению субстратам. Ряд исследователей считают, что
пероксидаза имеет один активный центр, в состав которого входит трех-
валентный атом железа, не меняющий своей валентности. Однако мно-
гофункциональность пероксидазы не исключает возможности наличия
и второго каталитического участка на поверхности нативной молекулы
белка.

РОЛЬ ПЕРОКСИДАЗЫ В РАСТИТЕЛЬНОМ ОРГАНИЗМЕ

2.1. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ

О важной физиологической роли этого фермента в клетках растений писал еще Д. М. Михлин [1947]. В настоящее время установлено, что активность изопероксидаз сильно зависит от присутствия субстратов и поэтому физиологические функции отдельных изоформ фермента значительно различаются [Gibson, Liu, 1978; Mäder, Amberg-Fischer, 1982]. Пероксидаза катализирует большинство реакций, протекающих во всех типах тканей. Для этого фермента многие авторы отмечают видовую [Ferri, Guzman, 1970; Sheep, 1970; Dumitrescu, Cartior, 1971; Cuzman et al., 1971; Папковская и др., 1974], органогенную [Klapper, Hackett, 1965; Botosaneanu, 1968], тканевую [Veech, 1969; Рубин, Будилова, 1970; Sheep, Redagay, 1970; Rücker, Radola, 1971] и внутриклеточную [Penpon et al., 1970; Будилова и др., 1971; Рубин, Ладыгина, 1974; и др.] специфичность распределения изопероксидаз.

Присутствие фермента в хлоропластах указывает на его участие в окислительно-восстановительных реакциях в процессе фотосинтеза [Воронков, Живописцева, 1970; Иванова и др., 1970; Рубин, Ладыгина, 1974], а обнаружение пероксидазы в митохондриях — на участие в энергетическом обмене клетки [Pleniscar et al., 1967; Ладыгина и др., 1970; Миронова, Сирота, 1977]. Значительная пероксидазная активность определена в очищенных препаратах рибосом [Lanzani, Calante, 1964; Penpon et al., 1970], и, как считают авторы, фермент прочно связан с их структурой, являясь, видимо, составной частью этих органелл. Специфичный набор изопероксидаз присутствует в паренхимных клетках клубней картофеля, определяя дифференциацию этих клеток [Borchert, 1974]. Максимальная пероксидазная активность обнаружена в эпидермисе и сосудисто-волокнистых пучках тканей чайного растения [Запрометов и др., 1982].

Японские исследователи [Matsushita, Ibuki, 1960] высказали предположение о существовании пероксидазной системы, связанной с метаболизмом рибонуклеопroteinов. Имеются данные об участии пероксидазы в окислительном декарбоксилировании аминокислот [Mazelis, 1962] и превращении триптофана в ИУК [Riddle, Mazelis, 1965].

На основании цитохимических исследований пероксидазная активность была обнаружена в цитоплазме, клеточной стенке, хромосомах и ядрышках. В молодых клетках кончиков лука наивысшая активность пероксидазы сосредоточена в ядрах [Ridge, Osborne, 1970; Raa, 1973]. Это свидетельствует о возможном участии пероксидазы в специфической ядерной функции, а так как часть изоэнзимов являются щелочными белками, то не исключено, что они могут выполнять функцию, подобную функции гистонов. Данные о роли пероксидазы в клетках, полученные на основе цитохимических исследований, находят все больше подтвержде-

ний и на биохимическом уровне. Так, Зигель и Галстон [Siegel, Galston, 1967b], изучая изопероксидазы гороха, показали увеличение числа щелочных изоэнзимов в связи с ростом и дифференциацией клеток. На этом основании ими высказано предположение, что щелочные пероксидазы могут функционировать как модификаторы генной активности.

Пероксидаза является индуцибельным ферментом, индукторами которого могут быть разнообразные физические, химические и биологические факторы, в том числе особого внимания заслуживают фитогормоны, как регуляторы многих физиологических процессов [Кулаева, 1978; Иштирякова, 1980]. Для пероксидазы доказано ее участие в образовании ауксина и этилена, восстановлении нитратов и нитритов, т. е. в азотном обмене, ростовых и дыхательных процессах [Рубин, Ладыгина, 1974]. В присутствии пероксидазы регулируется созревание и старение тканей, а также синтез лигнина, входящего в состав клеточных стенок. Возможно, физиолого-биохимическая роль пероксидазы клеточной стенки заключается в разрушении ИУК, которая может изменять физиологическое состояние клетки [Raa, 1973].

Пероксидаза ускоряет гидроксилирование пролина, входящего в состав клеточных стенок, что влияет на их растяжимость, и в результате регулируется проницаемость клеточных мембран [Ridge, Osborne, 1970]. Выяснено также, что пероксидазы клеточных стенок растений табака катализируют NADH-зависимое образование перекиси водорода [Mader, Amberg-Fischer, 1982]. Участие пероксидазы в окислительных превращениях $\text{NADP} \cdot \text{H}_2$ изучали на примере пероксидазы кукурузы, используя кофакторы оксидазной функции фермента Mn^{2+} и 2,4-дихлорфенол (ДХФ). При этом цианистый калий, ингибируя пероксидазу, уменьшал влияние Mn^{2+} и ДХФ на окисление $\text{NADP} \cdot \text{H}_2$ [Рубин и др., 1968].

Большую работу, освещающую различные стороны физиологических и биохимических свойств изопероксидаз растений табака, их родство к субстратам, провели Мэдер с сотр. [Mader, 1976, 1980; Mader et al., 1975, 1977, 1980]. Они разделили выделенный препарат фермента на четыре группы и охарактеризовали по подвижности в электрическом поле, по локализации в определенных компартментах клетки, по отношению к фенольным соединениям. Установлено, что в составе клеточных стенок присутствуют как анодные, так и катодные формы фермента. В цитоплазме в основном выявлены катодные пероксидазы. Так, пероксидаза PI не связана с клеточной стенкой, а PII и PIII обнаружены как ионосвязанными, так и ковалентносвязанными со стенкой клетки [Mader, 1976]. Изопероксидазы группы PI обладают наибольшим родством к искусственным субстратам, а группы PIII — к естественным. Высокое родство к искусственным субстратам может служить основой для предположения о том, что эти пероксидазы выполняют защитную функцию, освобождая клетки от чужеродного материала. При этом большое количество изоэнзимов пероксидазы позволяет окислять самые разнообразные вещества, увеличивая физиологическую значимость этого фермента. В опытах с каллюсной тканью табака было показано, что пероксидазы в ней менее гетерогенны, но активность таких изопероксидаз

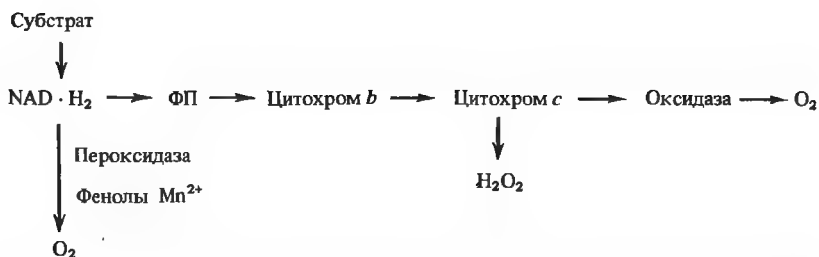
гораздо выше, чем в дифференцированных тканях. Преобладают в калюсе кислые формы фермента с изоэлектрическими точками в области pH 4,0—4,5 [Nessel, Mader, 1977].

Имеющиеся экспериментальные данные говорят в пользу того, что пероксидаза связана с целым рядом метаболических превращений, происходящих в клетках, обладая широким спектром действия фермента, в пределах pH от 3 до 14. Пероксидаза активизируется при очень многих изменениях и нарушениях метаболизма растений, а некоторые изоэнзимы в ответ на стресс синтезируются *de novo*. Однако до сих пор нет достаточно полного объяснения механизма регуляции синтеза изоэнзимов и проявления их свойств при стрессовых и патологических воздействиях. Несмотря на большой поток информации по изучаемому ферменту, физиологическая функция пероксидазы до конца не понята, и сложность ее изучения состоит в том, что действие фермента в нативной клетке невозможно со всей полнотой моделировать *in vitro*. Очевидно, именно этим объясняется то, что до настоящего времени нет единой теории о связи всех многообразных реакций, в которых участвует пероксидаза.

2.2. УЧАСТИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ В ДЫХАНИИ РАСТЕНИЙ

Все гетеротрофные организмы получают энергию в результате окислительно-восстановительных реакций, в которых электроны переносятся от доноров-восстановителей к акцепторам-окислителям. Каждый этап дыхания осуществляется при участии нескольких ферментов, связанных близостью функции. С эволюционной точки зрения целесообразность присутствия в клетке системы ферментов, выполняющих одну и ту же или сходную химическую реакцию, обеспечивает надежность прохождения дыхательного пути. Еще в начале столетия В. И. Палладин создал теорию, согласно которой полифенолы играют важную роль промежуточных катализаторов дыхания в растительном организме. Они были названы дыхательными хромогенами, которые обратимо превращаются в хиноны, а использование кислорода для окончательного окисления органического вещества совершается посредством промежуточных медиаторов. Окисление полифенолов и перенос ими кислорода на другие химические соединения происходят при непосредственном участии фермента пероксидазы.

Б. А. Рубин и Л. Н. Логинова [1973] показали, что пероксидаза может осуществлять альтернативные пути окислительно-восстановительных реакций. Так, одна или больше митохондриальных изопероксидаз участвуют в побочном пути электронного транспорта без связи с участком окислительного фосфорилирования. Пероксидаза может выполнять роль и анаэробной дегидрогеназы ($\text{NAD} \cdot \text{H}_2$ -дегидрогеназы или $\text{NAD} \cdot \text{H}$ -цитохром-с-редуктазы), что свидетельствует о вероятном функционировании этого фермента в качестве переносчика электронов. Электроны, полученные от восстановленных пиридиннуклеотидов, пероксидаза передает на различные акцепторы и, следовательно, представляет собой одно из звеньев цепи переноса электронов в митохондриальной альтернативной дыхательной цепи [Рубин, Ладыгина, 1974].



Б. А. Рубин и др. [1968] указывали на возможность участия пероксидазы в процессе аэробного дыхания и запасания энергии через окисление $\text{NAD} \cdot \text{H}_2$.

Г. Д. Миронова и Т. В. Сирота [1977] представили экспериментальные данные об участии пероксидазы в процессах, связанных с синтезом в митохондриях соединений, богатых запасенной энергией. Ими показано, что фосфорилирование сопровождается снижением количества перекиси водорода и повышением активности пероксидазы. Добавление фермента к митохондриям вызывает сопрягающий эффект, а ингибирование пероксидазы приводит к подавлению дыхания. При исключении перекиси водорода из инкубационной среды отмечается угнетение АТФ-синтетазной и АТРазной активности. Таким образом, пероксидаза является ферментом, регулирующим уровень перекисных соединений.

Ю. Н. Владимиров и А. И. Арчаков [1972] установили, что образование умеренного количества перекиси липидов в мембранах митохондрий оказывает положительный эффект на их функционирование. Следовательно, участие пероксидазы в процессах дыхания тесно переплетается с синтезом перекисей и регуляцией образования АТФ. А. М. Качурин и В. Н. Фомичев [1982] предполагают, что в транспорте электронов в дыхательной цепи участвуют ароматические аминокислотные остатки фермента, расположенные вблизи активного центра, и что они взаимодействуют как с π -электронной системой феррипорфирина, так и с π -электронами соответствующих субстратов.

Каждой из клеточных структур свойственны свои специфические дыхательные цепи, имеющие сходство и различия. Известно, что в случае снижения азрации органов растений активность пероксидазы резко возрастает, что указывает на определенную ее роль в использовании кислородных ресурсов клетки. Однако пероксидаза весьма сильно активируется и в условиях достаточного снабжения растительной клетки кислородом [Рубин, Ладыгина, 1974], что подчеркивает регуляторную функцию пероксидазы в дыхательных процессах растительного организма.

Характерное повышение дыхания наступает при различных стрессовых состояниях. Затем идет постепенное ослабление его интенсивности. Так, например, сразу после заражения растений вирусами активность дыхания повышается, а затем падает [Рубин и др., 1968; Рубин, 1975]. При этом пик активности дыхания зараженных тканей коррелирует с повышением деятельности окислительных ферментов и наступает раньше, чем произойдет накопление вирусных частиц. Это свидетельствует

о важной роли окислительных ферментов в проявлении защитных реакций до интенсивного размножения вируса. Увеличение активности пероксидазы связано с утилизацией перекиси водорода, образующейся в процессе усиленного дыхания зараженных тканей [Vegetti et al., 1975]. При нормальном дыхании здоровых тканей происходит непрерывное запасание энергии в макроэргических соединениях, а в тканях, зараженных вирусами, имеет место частичное или полное разобщение дыхания и фосфорилирования, которое и приводит к истощению энергетических запасов. Мерретт и Сандерленд установили, что общее усиление дыхания при вирусном поражении растений табака сорта Ксанти нк затрагивало гликолитический и пентозофосфатный пути [Merrett, Sunderland, 1967].

Таким образом, как при нормальном течении метаболизма, так и при его нарушениях пероксидаза играет важную роль в осуществлении процессов, связанных с дыханием растительного организма.

2.3. МНОЖЕСТВЕННОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ

Возникновение учения об изоферментах связано с пероксидазой. Впервые Теорелл [Theorell, 1942] разделил пероксидазу хрена на два компонента, отличающиеся по способности окислять флороглюцин. Позже была показана неоднородность и других ферментных белков. В 1965 г. Уилкинсон отнес пероксидазу к числу ферментов, для которых доказано присутствие множественных молекулярных форм [Уилкинсон, 1968]. Диксон и Уэбб [1966] считают открытие множественности ферментов одним из наиболее интересных событий в биохимии. Первая попытка обобщить данные о множественных формах ряда ферментов, их распределении в тканях и изменении в онтогенезе, была предпринята Маркертом и Мёллером [Markert, Möller, 1959]. Они же впервые предложили называть изоэнзимами разные молекулярные формы одного фермента, катализирующие одну и ту же реакцию, но разделяющиеся физико-химическими и иммунохимическими методами. В 1964 г. этот термин был официально утвержден Международным союзом биохимиков.

Международная подкомиссия по изоферментам рекомендует различать «множественные формы ферментов» как широкий термин, применяемый к белкам, обладающим одной и той же ферментативной активностью и встречающимся у одного и того же вида, и изозим (изофермент), применяемый лишь к множественным молекулярным формам ферментов с генетически детерминированными различиями в первичной структуре. Стаман и Деморест [Stahmann, Demorest, 1963] считают, что множественными формами представлены ферменты, осуществляющие контроль за общими стадиями синтеза и распада органических соединений.

По данным разных авторов [Серов, 1968; Markert, Whitt, 1968; Harris, 1969; Markert, 1975], в основе множественности молекулярных форм ферментов (ММФФ) лежат следующие молекулярные механизмы как генетического, так и эпигенетического характера: 1) многие ферменты состоят из нескольких полипептидов, кодируемых отдельными аллельными или неаллельными генами, такие полипептиды могут соединяться

в гомо- и гетерополимеры; 2) отдельные ферменты могут существовать в виде серии полимеров разного размера, например моно-, ди-, тетрамеров и т. д.; 3) полипептидные цепи иногда вторично подвергаются химическим модификациям без существенного изменения основной ферментативной функции; 4) в некоторых случаях молекулы фермента, не теряя основной своей функции, существуют в разных конформационных состояниях за счет пермутации полимерных субъединиц или альтернативной третичной и четвертичной структуры белков.

Открытие изоферментов предоставило широкую возможность для постановки и разрешения некоторых кардинальных проблем энзимологии, генетики, эволюционного учения и систематики. К настоящему времени стало ясно, что множественность молекулярных форм ферментов, и не только ферментов, является общим правилом. Наличие многообразия таких форм расширяет биохимические возможности белков. Как пишет П. С. Редькин [1974], каждый изофермент можно условно определить как элементарную информативную единицу метаболической и генетической регуляции. По мере усложнения жизни происходило развитие изоферментных систем, сопровождающее дифференциацию и интеграцию структурных уровней организации, что обеспечило увеличение независимости организма от внешних факторов.

А. М. Голдовский [1972] считает, что главной причиной множественности является сам механизм химических реакций. Каждый фермент или сочетание ферментов, подобно всякому катализатору, делают возможным прохождение соответствующего химического процесса с необходимой скоростью, но не устраняют в этом процессе других, побочных направлений. Это создает большую пластичность приспособления биохимической деятельности организма к непрерывно изменяющимся условиям среды. Ферменты, представленные в виде одной полипептидной цепи, такие, как пероксидаза, обладают наибольшей степенью молекулярной гетерогенности. Их изоэнзимный набор состоит из кислых, нейтральных и щелочных форм. Очевидно, у таких ферментов большую роль играют модификации за счет присоединения различных кофакторов и определенной полимеризации с другими соединениями, например с сахарами и фенолами. Исследования, проведенные с использованием пероксидазы хрена, показали, что разнообразие изоформ этого фермента может быть результатом гликолизирования определенных аминокислотных остатков [Morita et al., 1971; Войлоков, Нарбут, 1974; Войлоков, 1978]. Таким образом, создается многообразие, которое в пероксидазе хрена представлено 42 молекулярными формами, или изоэнзимами [Hoylee, 1977].

Регуляция активности ферментов чаще всего осуществляется торможением реакции ее конечными продуктами, репрессией по типу обратной связи, или «ретроингибированием». Если бы в клетке присутствовал только один тип молекул фермента, то ретроингибирование продуктом реакции могло бы остановить реакцию. Однако в случае пероксидазы давно замечено, что если один изоэнзим репрессируется продуктами своей деятельности, то другой, наоборот, этими же продуктами может активизироваться. Индивидуальные изопероксидазы различаются по своей способности катализировать реакции окисления различных субстратов [Gibson, Liu, 1978].

Методом микроэлектрофореза и электрофокусирования было показано существование изоэнзимов пероксидазы, проявляющих различную активность, но идентичных по относительной электрофоретической подвижности. Так, белковые зоны одновременно могут проявлять пероксидазную, полифенолоксидазную, цитохромоксидазную и эстеразную активность [Jaaska V., Jaaska V., 1969; Sheen, Calvert, 1969; Ладыгина и др., 1970, 1972]. Н. Д. Тупик [1972] и Сахулка [Sahulka, 1970] отмечают, что из шести идентифицированных изоэнзимов пероксидазы половина обладала также и ауксиноксидазной активностью. Причина проявления разной ферментативной активности одним и тем же изоэнзимом не ясна. Высказываются предположения, что действие пероксидазы и полифенолоксидазы функционально сопряжено, при извлечении белков они могут структурно связываться, образуя белковый комплекс [Sheen, Calvert, 1969]. Вполне возможно также, что при электрофорезе изоэнзимы разных ферментов, имея одинаковый заряд, движутся вместе и дают полосы с одинаковым значением R_m . Однозначного ответа на этот вопрос пока нет.

Многочисленные данные подтверждают наличие у растений как ферментов, общих для всех тканей, так и изоэнзимов, специфичных только для отдельных органов или появляющихся лишь в определенные периоды развития организма [Shannon, 1968; Jaaska V., Jaaska V., 1969; Scandalios, 1969; Рубин, Будилова, 1970; Брежнев и др., 1970; Сафонова и др., 1970]. Это свидетельствует о дифференцированной активности генов, контролирующих биосинтез определенных изоферментов в отдельных тканях и органах [Яаска В., Яаска В., 1971].

Как считает Скандалиоз [Scandalios, 1969, 1974], отдельные изопероксидазы несут различные функции *in vivo*, но могут проявлять перекрывающуюся специфичность к субстратам, когда они испытываются *in vitro*, вследствие чего пероксидаза, скорее всего, есть «семейство» ферментов. В пользу этого говорит и то, что отдельные изопероксидазы различаются по многим характеристикам. Гибсон и Ли [Gibson, Liu, 1978] поддерживают мнение, что пероксидаза представляет собой семейство близко связанных по действию, но различающихся генетически ферментов.

2.4. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ СИНТЕЗА

В деле изучения генетического контроля синтеза различных ферментных белков важную роль сыграло предложение Хантера и Маркета [Hunter, Markert, 1957] использовать для этой цели метод зимограмм, основанный на способности высокомолекулярных соединений разделяться в электрическом поле. Совершенствование методов исследований и дальнейшее изучение электрофоретических спектров различных белков показали, что множественность молекулярных форм ферментов (ММФФ) является правилом для всех ферментов. Одной из причин существования различных форм изоэнзимов может служить множественность генетических локусов, образующихся в результате дупликации генов в процессе эволюции [Moss, 1982]. Дупликация является основным путем начала дивергенции белков и даже возникновения их с новыми функ-

циями. Она дает возможность одному гену изменяться, тогда как другой, его дублир, подолжает обеспечивать старую функцию [Хесин, 1975, 1980].

Давно установлено, что синтез белка идет под контролем определенного гена или нескольких генов. Однако, как пишут Э. В. Луговской и Н. В. Кивенко [1985], взаимосвязь между генами и синтезированными на их основе белками намного сложнее, чем это еще недавно представлялось. Так, некоторые локусы могут кодировать, кроме пероксидазы, и другие ферменты, например фосфатазу и эстеразу [Rick et al., 1974]. Строение молекулы пероксидазы свидетельствует о том, что за биосинтез этого фермента отвечает не менее трех систем структурных генов [Tyson et al., 1978]. Макникол [Macnicol, 1973], характеризуя изоферментный спектр пероксидазы и генотипы растений гороха, сделал вывод, что изоэнзимы C_3 и C_4 контролируются аллелями одного и того же гена. Хоез с сотр. [Hoess et al., 1974], скрещивая растения близких видов табака (*Nicotiana langsdorffii* и *N. sanderae*), установили, что анодный изоэнзим пероксидазы контролируется геном Px_1 с двумя кодоминантными аллелями — Px_1-1 и Px_1-2 . Авторы считают, что ген Px_1 сцеплен с геном, определяющим окраску.

Генетический анализ изоферментов пероксидазы и их органной специфичности у различных гибридных растений риса провели Пай и др. [Pai et al., 1973]. Идентифицированные ими гены Px_2 , R_{LB}^{4C} , R_{LS}^{4C} контролируют один из изоэнзимов пероксидазы — $4C$, и, следовательно, синтез только одной полипептидной цепи могут определять три различных гена. Последние два гена рассматриваются как «регуляторные гены», контролирующие активность Px_2^{4C} . Ген R_{LB}^{4C} функционирует в тканях листовых пластинок, другой, R_{LS}^{4C} — в тканях влагалища.

Структурный ген $grxD$ у петунии кодирует медленную анодную пероксидазу, чувствительную к высоким концентрациям перекиси водорода [Hartings, Wijsman, 1985]. Исследователи выяснили, что этот ген контролирует синтез двух различных электрофоретических вариантов изопероксидаз. С помощью четырехточечного скрещивания, с использованием генов $grxA$, $grxD$, MfI и HfI , было выяснено, что ген $grxD$ был локализован в хромосоме III. Установлено, что изофермент, контролируемый геном PRX , присутствует в зрелых и старых листьях и тканях стебля взрослых цветущих растений. Вместе с тем этот изоэнзим отсутствует в тканях венчика цветка и корнях.

Вопрос о регуляции генной активности, в результате которой осуществляется синтез того или другого изоэнзима, пока остается открытым [Созинов, 1985]. Ряд авторов считают, что ведущая роль в этом процессе может принадлежать фитогормонам [Galston, Davies, 1969; Кефели, 1970, 1973]. Так, установлено, что ИУК регулирует уровень активности двух катодных изопероксидаз, связанных с рибосомами. При этом эффект влияния фитогормона на синтез этих изоэнзимов можно объяснить через его действие на уровне экспрессии определенного гена [Pennon et al., 1970].

Изменение состава изопероксидаз может происходить и под влиянием различных индукторов, но, как считает А. В. Войлоков [1978], способность к индукции генетически детерминирована и находится под

контролем доминантного гена. Скандалиоз посвятил этому вопросу две обзорные статьи, в которых приводится обширный материал по генетическому контролю многообразия молекулярных форм различных ферментов (каталазы, пероксидазы, фосфатазы, лактатдегидрогеназы и др.), их значению в развитии и дифференциации растительных тканей [Scandalios, 1969, 1974]. Он считает, что пероксидаза является менее подходящим ферментом для генетических исследований, так как имеет в своем составе большое число физиологически лабильных изоэнзимных форм.

Действительно, при сравнительном изучении гибридов сложность изучения этого фермента состоит в том, что часть изопероксидаз родительских форм может отсутствовать в спектре из-за репрессии некоторых форм [Gleba, Hoffmann, 1978]. Возможна и дерепрессия генов, нефункциональных в родительских клетках, или увеличение числа изоэнзимов за счет посттрансляционной модификации фермента в гибридной клетке. Однако накопленный фактический материал свидетельствует о возможности использования изоэнзимов фермента пероксидазы в качестве генетических маркеров [Титов, 1975, 1978]. Генетическое и биохимическое изучение отдельных изоферментных систем в процессе индивидуального развития дает наибольшую информацию о действии гена и контроле генной активности у высших растений.

2.5. ИЗОЭНЗИМЫ — МАРКЕРЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Каждый белок — уникальный продукт своего гена и может служить надежным маркером этого гена. Так как молекула любого белка-фермента обладает определенной биохимической специфичностью, то маркирование белками биологических свойств и различных признаков растений возможно через генетические системы. При этом способ маркирования в каждом отдельном случае определяется характером признака и организацией кодирующей системы [Конарев, 1985]. В случае пероксидазы отдельные ее изоэнзимы тоже могут быть уникально представлены у различных генотипов растений. Это дает возможность обнаружить генотипы по присутствию характерных для них изоэнзимов в генетически неоднородном материале. Характеристика гибридных растений по составу белков-маркеров — надежный критерий оценки исходного и полученного материала [Конарев, 1983]. Автор считает, что по спектрам полиморфных белковых систем наиболее эффективна также оценка популяций на экологическую пластичность. При этом отдельные типы спектра белка могут быть маркерами тех генетических систем, которые непосредственно участвуют в адаптации популяции к меняющимся условиям среды, в том числе к неблагоприятным факторам.

В последние годы все чаще появляются статьи, в которых авторы предлагают использовать спектр изоэнзимов пероксидазы и других ферментов как диагностический признак для биохимических исследований [Vigilina, 1980; Karege et al., 1982; Духарев и др., 1983; Тютюрев и др., 1983; Vahl, Müller, 1984]. Об использовании молекулярных форм ферментов в качестве генетического теста пишут Смит и сотрудники, которые проанализировали 61 вид рода *Nicotiana* и нашли, что для растений

этих видов характерно присутствие 33 различных изоэнзимов пероксидазы, в разных сочетаниях распределяющихся у растений, изучаемых видов этого рода [Smith et al., 1970, 1976]. Авторы идентифицировали в среднем по семь изопероксидаз на один вид. Однако для некоторых видов (*N. tomentosa*, *N. tomentosiformis*, *N. corymbosa*) их могло быть и по десять. Судя по электрофоретическим спектрам, лишь один из изоэнзимов был общим и обнаружен у 32 исследуемых видов растений этого рода. Это свидетельствует о том, что спектр зимограмм пероксидазы является хорошим тестом при сравнительном анализе исследуемых растений.

Пероксидаза — функционально очень лабильный фермент, способный реагировать на большинство нарушений гомеостаза. При этом происходят изменения как в наборе молекулярных форм фермента, так и в проявлении их активности. Болгарские ученые [Nakov et al., 1982; Янкулова, Качармазов, 1984] считают, что пероксидазный тест можно использовать при оценке селекционного материала на вирусоустойчивость. Ранее Шин и Дайхун [Sheep, Diachun, 1978a], применяя метод перекрестного скрещивания внутри клонов красного клевера, зараженных изолятом 204-1 вируса желтой мозаики сои, установили, что катодный изоэнзим пероксидазы «С₂» оказывает модифицирующее действие на метаболизм клетки, способствуя локализации вируса в местах его проникновения. Исследователи установили принадлежность к одной группе сцепления генов, отвечающие за синтез катодного изоэнзима «С₂» и за признаки сверхчувствительности к заражению вирусом. Авторы предлагают этот изоэнзим пероксидазы использовать как генетический маркер при селекции красного клевера на устойчивость к этому вирусному заболеванию.

Изложенное выше свидетельствует о том, что, используя пероксидазные маркеры, удастся более полно характеризовать защитные механизмы растений и найти подходы для диагностики устойчивости к вирусам у разных сортов сельскохозяйственных культур, что позволяет вести селекцию на основе определенной научной объективности.

ГЛАВА 3

НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ ИММУННОГО ОТВЕТА

3.1. ПРИНЦИП ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЙ

Иммунитет любой системы — это способность организма идентифицировать, нейтрализовать и удалить чуждые структуры в целях сохранения собственной целостности. Иммунологический контроль животных делится на клеточный и гуморальный (антитела), где общая система функционирует как единое целое. В животном организме лимфоциты (10^{12}) и иммуноглобулины (10^{12} молекул) призваны распознавать антигены. Антигенами могут быть молекулы и клетки, не принадлежащие организму или образовавшиеся из собственных метаболитов в результате их

физиологического или патологического изменения. Обнаружив (как?) антиген, иммунная система должна его обезвредить. Для этой цели в организме действуют сопряженно Т-клетки, антитела и В-клетки [Петров, 1982]. Фагоцитоз и внутриклеточное разрушение антигенов производят макрофаги.

Иммунная система животных реализуется таким образом, чтобы ответная реакция наступала в нужный момент, была направлена на определенный антиген, была адекватна и строго ограничена во времени. Такая защитная функция возникла давно в процессе эволюции из клеток двух типов — лимфоцитов и макрофагов. Если эти условия защиты в силу определенных причин не могут обеспечить устойчивое состояние организма, он заболевает и погибает. Чтобы предотвратить заболевание, антиген метится специфическим антителом и присоединяется к Т-клетке или макрофагу. Роль макрофагов состоит в превращении антигенов в иммуноген, т. е. в соединение, способное индуцировать образование антител, и т. д. Механизм этого процесса и природы иммуногенов пока до конца не выяснены.

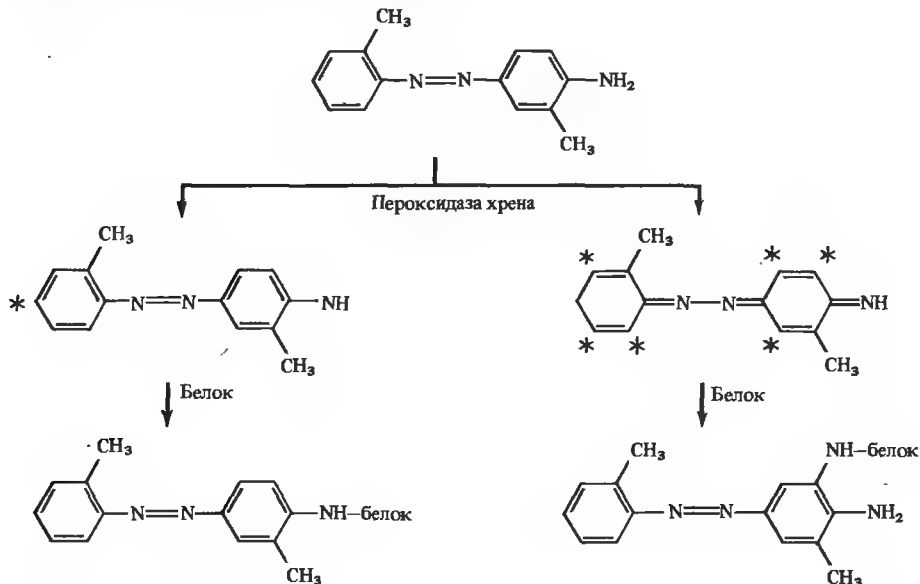
Для растений все обстоит несколько иначе. Однако сравнительно давно существует мнение, что в растительном организме также возникают белки, подобные антителам, но продолжительность их жизни сравнительно невелика [Сухоруков, 1986].

Взаимодействие по типу антиген—антитело основано на ионной связи, сущность которой состоит в возникновении положительно и отрицательно заряженных ионов. Прочность связи между антигеном и антителом невелика и занимает промежуточное положение между прочностью водородной связи и гидрофобных взаимодействий. Такие полярные связи осуществляются между ионизирующимися группами пептидных цепей как внутри одной молекулы, так и между различными молекулами, а также при взаимодействии макромолекул с низкомолекулярными органическими и неорганическими ионами. Взаимодействие последнего типа вполне может осуществлять фермент пероксидаза, имеющий в своем составе реакционноспособные COOH , NH_2 - и SH -группы.

Поскольку антигенами могут быть самые различные соединения, вполне возможно, что пероксидаза при участии своих субстратов — фенолов, аминосоединений и перекиси водорода — может выполнять окислительно-восстановительный акт, в результате которого идет утилизация ненужных клетке соединений. Это подтверждается тем, что фермент отличается очень широкой субстратной специфичностью и диапазон субстратов до конца не выяснен. Например, пероксидаза хрена может окислять ароматические диамины до реакционноспособных хинондииминов [Claiborne, Fridovich, 1979], которые вступают в реакцию с белками и дают конъюгаты этих аминов.

В основе образования конъюгатов лежит следующий принцип. Окисление фенолов и ароматических аминов, катализируемое пероксидазой, протекает по свободнорадикальному механизму с образованием хинонов [Саундерс, 1978]. При этом как промежуточные свободные радикалы, так и хиноны обладают высокой реакционной способностью. Первые могут ковалентно связываться с цистеином, тирозином и гистидином белков, вторые активно реагируют со свободными amino- и тиольными

группами белков. Таким образом, фермент осуществляет биоактивацию антигенов за счет своих субстратов и перекиси водорода, подготавливая их для конъюгации с другими носителями: белками, полисахаридами, гликопротеинами и др. [Ковалев, Полевая, 1985]. Авторами показана принципиальная возможность образования конъюгированного антигена (о-аминоазотолуол — бычий сывороточный альбумин) ферментативным методом с помощью пероксидазы хрена. Аналогичные конъюгаты были также получены и с пероксидазой сыворотки крови. На предложенной ими схеме представлены конъюгированные антигены и указаны возможные участки связывания их с белком:



* Другие возможные участки присоединения

Комплексы конъюгированных антигенов в организме животных индуцируют синтез антител, специфически связывающих антигены [Ковалев, и др., 1984]. Такого типа иммунологический контроль является общей функциональной системой, обеспечивающей утилизацию антиметаболитов. При этом биоактивация в присутствии пероксидазы—H₂O₂ различных соединений свидетельствует о необходимости функционирования окислительной системы в защитных реакциях организма. Получение конъюгированных антигенов с пероксидазой как растительного, так и животного происхождения определяет принципиальную возможность участия этого фермента в иммунологическом контроле живых организмов. Если иммунология животных достигла практически своего теоретического предела (радиоиммунологический метод по своей чувствительности позволяет определять 10⁻⁹ молекул вещества в 1 мл раствора) и с помощью серологических тестов можно обнаружить единичные молекулы антигенов и антител, то в области растительной иммунологии до такого совершенства еще слишком далеко.

В настоящее время тесты оценки общей функциональной иммунологической системы растений слишком слабо разработаны. Однако растительная пероксидаза в качестве фермента-маркера находит все более широкое применение в иммунологических исследованиях. Так, например, методом периодатного окисления удается пометить до 99% молекул антител с максимальной плотностью 5—6 молекул пероксидазы на молекулу иммуноглобулина [Bercks et al., 1974]. Следовательно, сама молекула пероксидазы представляет собой весьма удобный для конъюгирования белок [Avrameas, 1969; Дзантиев, Егоров, 1982], имеющий в своем составе не только реакционноспособные группы, но и углеводные компоненты. Наличие функциональных групп и гликопротеидная природа позволяют этому ферменту осуществлять ковалентное связывание с различными соединениями, а в присутствии галогенов и перекиси водорода выступает как антибактерицидный комплекс, о чем речь пойдет ниже.

3.2. АНТИПАТОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ

Симонс и Росс [Simons, Ross, 1965, 1970], обосновывая участие пероксидазы в процессах устойчивости к вирусному поражению, предположили, что фермент убивает инфицированные клетки и таким образом подавляется размножение вируса. В дальнейшем в это предположение вносились поправки, и теперь уже ясно, что образование некроза прямо не связано с действием этого фермента. Некроз образуется при активации ряда ферментов, но один из них, а именно фенилаланин-аммиак-лиаза, является непосредственным маркером некрозообразования [Vegetti et al., 1975].

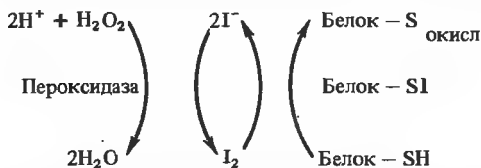
Прямое действие пероксидазы растений на патоген было показано для некоторых животных объектов. Так, Венере [Venere, 1980] установил, что пероксидазы из семян хлопчатника, устойчивого к увяданию, образуют продукт, который был бактерицидным к *Xanthomonas malvacearum* при условии, если в инкубационную среду добавляли катехин и перекись водорода. Последние соединения накапливаются в зараженных растениях. Установлено также, что сильным антимикробным действием обладали системы миелопероксидаза или лактопероксидаза-перекись водорода — галоген [Jago, Morrison, 1962; Klebanoff, 1968; Klebanoff, Hamon, 1972]. В присутствии перекиси водорода и йодида калия миелопероксидаза и пероксидаза хрена быстро убивали сходные по патогенности виды грибов и бактерий. Интересно отметить, что бактерицидное действие этой системы усиливали некоторые фенолы [Urs, Dunleavy, 1974, 1975].

Роли пероксидазы в защитном механизме клеток животных посвящено много работ. Установлено, что у больных с тяжелыми и длительными инфекциями, когда организм уже не в состоянии защищаться, резко снижается количество пероксидазоположительных гранул и после этого судьба организма практически предreshена [Роговин и др., 1977]. Авторы пишут, что снижение и исчезновение миелопероксидазы сопровождается ослаблением антимикробной активности, а также о прямом участии пероксидазной системы в повышении защитной функции различных организмов, в том числе человека.

Изменение активности пероксидазы при патологиях начали детально изучать только после того, как была осознана та огромная роль пероксидазных систем, которую они играют в метаболических процессах [Klebanoff et al., 1966; Klebanoff, 1968]. Действие животных пероксидаз (миелопероксидаза, лактопероксидаза и др.) основано на том же принципе, что и действие растительных пероксидаз,— на окислении различных субстратов в присутствии перекиси водорода. Это обязательное условие каталитического акта пероксидаз различного происхождения и объединяет их в один тип таких ферментных белков. В организме человека и животных существует несколько пероксидаз, сходных функционально, но отличающихся друг от друга по некоторым свойствам и специфичности по отношению к субстратам [Шафран, 1981].

Для большинства пероксидаз животных установлено их сильновыраженное бактерицидное и антипатогенное действие. Так, для больных пародонтозом показано значительное увеличение активности пероксидазы, которое прямо коррелирует с тяжестью заболевания [Барабаш и др., 1979]. Миелопероксидаза—перекись водорода—йодид калия являются совершенно необходимой системой для антимикробного действия, но надо учитывать, что высокая активность пероксидазы обеспечивается целой группой соединений, связанных с окислительно-восстановительными процессами. Пероксидазы, катализирующие йодирование биологических молекул, должны определять устойчивость к вирусной и микробной инфекции [Klebanoff, Naton, 1972].

Лактопероксидаза, миелопероксидаза или пероксидаза корней хрена катализируют H_2O_2 -зависимое окисление сульфидрильных групп белков в присутствии йода [Thomas E., Thomas M., 1977]. Данные этих авторов свидетельствуют о том, что пероксидаза может взаимодействовать непосредственно с белками патогенов по следующей схеме:



Вопрос о возможной реакционной связи пероксидазы с белками имеет принципиальное значение для понимания роли этого фермента в зараженном организме как животных, так и растений. Антивирусное действие системы пероксидаза хрена—йодид калия—перекись водорода было испытано для вируса мозаики южных бобов, который быстро инактивировался при соответствующей обработке [Urs, Hill, 1978]. Так как основными субстратами фермента пероксидазы являются фенольные соединения, то система пероксидаза—йодид калия—перекись водорода и фенолы могут составлять часть общего защитного механизма растений. Поэтому в настоящее время необходимы поиск и разработка тестов оценки функциональной активности иммунных реакций растительных организмов, в которых задействована и пероксидаза.

3.3. «ПАТОГЕНЕЗОЗАВИСИМЫЕ» БЕЛКИ РАСТЕНИЙ

Универсальным естественным ингибитором, подавляющим репродукцию вируса на раннем этапе патогенеза, являются интерфероноподобные белки растений. Но это действие очень короткое, длится у животных до выработки антител, а у растений интерфероноподобные белки хотя и действуют более длительное время, но совершенно неизвестно, какой защитный механизм приходит им на смену, охраняя жизненно важные процессы метаболизма. Установлено, что вирус, попадая в клетки растений, индуцирует появление белков, тесно связанных с устойчивостью [Loon, 1976 a, b; Antoniow, White, 1980; Antoniow et al., 1980; Kassanis, 1980, 1981]. Кассанис так их и назвал — «белки, связанные с устойчивостью» — RAPs [Kassanis, 1981]. Они были идентифицированы вначале в местах образования некрозов, а затем в неинкулированных, вышележащих листьях растений табака. В отношении того, как называть эти белки, пока нет единого мнения. Некоторые авторы обозначают эти белки двумя английскими буквами и называют их «патогенезозависимые» белки («pathogenesis-related» proteins) или PR-proteins [Antoniow et al., 1980].

Фразер [Fraser, 1981] показал, что 4 кодируемых хозяином «патогенезозависимых» белка накапливаются при формировании локальных некрозов в различных растениях табака после их инфицирования ВТМ. Он считает возможным участие этих белков в вирусиндуцированной системной устойчивости. Однако эти же белки обнаружены им в здоровых растениях во время цветения, и поэтому вопрос об активном участии их в устойчивости растений к вирусам остается пока дискуссионным [Fraser, Clay, 1983]. Кассанис [Kassanis, 1981] считает, что один или больше из этих белков все-таки играют определенную роль в приобретенной устойчивости.

В работе Джемита и соавт. [Jamet et al., 1985] приводятся данные о включении меченых аминокислот в «патогенезозависимые» белки листьев растений табака сорта Samsun NN, зараженных вирусом табачной мозаики. Авторы показали, что если впрыснуть радиоактивные аминокислоты в черешок листа через 3 дня после инокуляции, то метятся прежде всего белки, связанные с патогенезом. В другом варианте опыта листья выдерживали на инкубационной среде, содержащей меченые аминокислоты, и они также обнаружили метку в составе изучаемых белков. Идентифицируя белки в денатурирующих и неденатурирующих условиях электрофореза, авторы пришли к выводу, что, скорее всего, «патогенезозависимые» белки синтезируются *de novo*, хотя нельзя окончательно отрицать возможность их возникновения при протеолитическом расщеплении структурных белков в ответ на поражение вирусной инфекцией.

Применяя различные варианты подкормки ^{14}C -мечеными аминокислотами и используя электрофоретическое разделение экстрактов из листьев зараженных и контрольных растений табака, авторы выявили не менее 10 белков, связанных с развитием заболевания. Оказалось, что эти белки устойчивы к трипсину, химотрипсину и к эндогенной протеазе растения-хозяина. Они избирательно экстрагируются при низком значении pH. Авторы считают, что определение этих белков может быть

полезным биохимическим показателям экспрессии генов в зараженных растениях. Тем более что не исключается возможность синтеза некоторых из них *de novo* [Antoniw, Pierpoint, 1978].

Один из таких белков, связанных с патогенезом, обладает очень сильным антивирусным действием и в концентрации 1 пМ полностью подавляет размножение вируса табачной мозаики в листьях *N. glutinosa* L. [Sela, 1981]. Этот белок имеет гликопротеидную природу и каким-то образом связан с функцией гена *N*. Это интересно, поскольку пероксидаза также является белком гликопротеидной природы. Кроме того, антитела животных в своем составе обязательно содержат углеводные компоненты.

Вопрос о роли этих белков в проявлении устойчивости остается открытым. Как подчеркивает Гаррисон [Harrison, 1982], для полного понимания процессов устойчивости мы слишком мало знаем о реакциях, которые участвуют в активных защитных механизмах растений-хозяев. Ясно, что в этом процессе задействованы вирусоспецифические белки и ферменты многих метаболических путей. Однако при проявлении системной устойчивости не ясно, какова роль именно этих «вновь» синтезируемых белков. И ни одно из объяснений пока нельзя считать окончательным.

3.4. ЛИГНИН КАК ФАКТОР ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Ленинджер [1985] пишет, что клеточные стенки высших растений можно сравнить с железобетоном, в котором заключены целлюлозные волокна, матрикс и лигнин. Нас интересует последнее соединение, важным свойством которого является его устойчивость к различным микроорганизмам. И второй аспект — это то, что образование лигнина идет с участием полифеноксидазы, лакказы (фенолоксидазы) и пероксидазы.

Трудность изучения процесса лигнификации в том, что лигнин не является индивидуальным соединением строго определенного состава. По своей химической природе он представляет собой трехмерный полимер, в состав которого входят соединения различной фенольной природы. Синтез лигнина идет через шикимовую кислоту, а также включает соединения С₆—С₃-ряда, к которому относятся оксикоричные спирты: *n*-кумаровый, конифероловый и синаповый. Из числа оксibenзойных кислот ванилиновая и особенно сиреневая кислоты в виде эфиров также включаются в лигнин [Кретович, 1986]. В этом случае для соединений лигнина характерна сложноэфирная связь, образуемая за счет фенольной гидроксильной группы одной молекулы фенолкарбоновой кислоты и карбоксильной группы другой. Так, некоторые фенольные соединения, например *n*-кумаровая и феруловая кислоты, могут быть связаны эфирными связями с лигнинами [Scalbert et al., 1985], а их превращения идут с участием фермента пероксидазы, встроенного в клеточную стенку. Предшественниками синтеза лигнина у травянистых растений являются фенилаланин и тирозин. Этот краткий перечень молекул, участвующих в образовании лигнина, в том числе полифенолоксидаза, лакказы и пероксидазы, которые катализируют образование этого сложного полимерного соединения клеточных

стенок, дает основание говорить о сложности расшифровки метаболической взаимосвязи различных соединений в процессе лигнификации.

При поражении тканей вновь синтезированный лигнин участвует в заживлении клеточной стенки и в таком случае выполняет функцию защиты клеток от проникновения патогенов [Vance et al., 1980]. При определенных взаимодействиях хозяин—патоген происходит увеличение активности пероксидазы, которая может участвовать в формировании лигнина. Так, было показано, что циклогексимид ингибирует устойчивость растений проса к *Helminthosporium avenae*, блокирует биосинтез лигнина и активность ферментов, включающихся в формирование лигнина, в том числе пероксидазы [Vance et al., 1976; Vance, Sherwood, 1976].

Активное участие лигнина в защитном механизме растений, пораженных различными патогенами [Vance et al., 1980; Hammerschmidt, Kus, 1982], имеет место именно там, где образуются некрозы и поражения. Причем, как считают многие авторы, в синтезе лигнина принимают участие только пероксидазы, ковалентно- и ионосвязанные с клеточной стенкой [Mader, Amberg-Fischer, 1982; Mader, Fussl, 1982 и др.]. Эти исследователи также показали, что процесс образования лигнина зависит от окисления NADH в присутствии перекиси водорода. Лигнифицирование тканей может индуцироваться возбуждателями различных заболеваний, и начинается оно с превращений фенилаланина [Vance et al., 1980].

Становится очевидным, что лигнификация клеток — сложный многоступенчатый процесс, на завершающем этапе которого может принимать участие и фермент пероксидаза. *In vivo* в образовании лигнина участвуют лишь изоэнзимы, локализованные в клеточных стенках, а именно ионо- и ковалентносвязанные формы [Mader et al., 1975]. Предстоит выяснить, может ли значительно усиливаться образование лигнина в клетках растущих листьев зараженных растений, если в них отсутствуют вирусные частицы, когда вирус локализован в нижних листьях, а в молодых индуцируется устойчивость к повторному заражению и одновременно возрастает активность растворимых изопероксидаз? По всей вероятности, процесс лигнификации в них не должен преобладать, так как в молодых листьях таких растений отсутствуют зрелые вирусные частицы. К тому же установлено, что свободнорастворимая пероксидаза не лигнинолитический фермент [Hartenstein et al., 1977].

3.5. УЧАСТИЕ ЭТИЛЕНА В ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЯХ

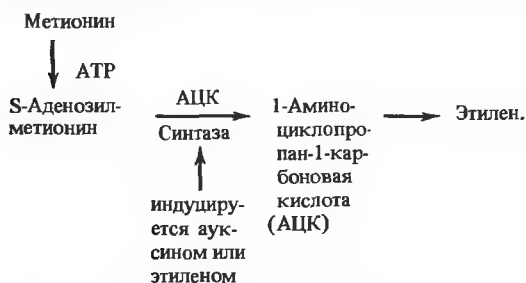
Одним из растительных гормонов, которому приписывается способность индуцировать деятельность ферментов, является этилен [Herrero, Hall, 1960; Riov et al., 1982]. Молекула этилена имеет в своем составе ненасыщенную двойную связь ($H_2C=CH_2$), и поэтому он весьма реакционноспособен и оказывает действие на все вегетативные органы растения. Внутриклеточно образование этилена может идти при превращениях многих молекул в присутствии перекисного окисления. Так, например, ионы меди индуцируют светозависимое перекисное окисление

липидов мембран, ведущее к образованию этилена [Sandmann, Böeget, 1980].

Чандре и Спенсер методом дифференциального центрифугирования изолировали митохондрии из плодов томатов и показали, что в среде, содержащей сахарозу, фосфат, Mn^{2+} , Mg^{2+} , АТФ, NAD и яблочную кислоту, разрушенные митохондрии начинали интенсивно выделять этилен. NAD может и замедлять образование этилена, а АТФ, Mg^{2+} — ускорять этот процесс [Chandra, Spenser, 1962]. Остается невыясненным, почему именно разрушенные, а не целые митохондрии синтезировали этилен. Связано ли это только с усилением дыхания разрушенных митохондрий? Известно, что образование этилена тесно связано с процессом дыхания.

В опытах с меткой показано, что радиоактивный ^{14}C -этилен включается в бензол и затем метка обнаруживается в продуктах превращения: бензоилпропионовой кислоте, бензойной кислоте и парафенилфенацил-бензоате [Jansen, 1964]. Полученные производные обладали одинаковой удельной радиоактивностью. Эти опыты свидетельствуют о том, что этилен является активным метаболитом растительной клетки, и проливают свет на пути его превращений. Синтез этилена был также обнаружен в тканях животных объектов, и вполне возможно, что биосинтез и превращения этого метаболита в растительных и животных тканях осуществляются по одной химической схеме.

Синтез этилена тесно связан с метаболизмом метионина и его аналогов, один из них — метиональ [Loat et al., 1981]. Некоторые изопероксидазы катализируют образование этилена из метионаля [Gaspar et al., 1982], и есть предположение, что хлорогеновая и кофейная кислоты могут ингибировать катализируемое пероксидазой образование этилена из аналогов метионина. Энзиматический синтез этилена из предшественника метионина — метионаля осуществляется в присутствии ферментов и кофакторов [Mapson, Wardale, 1968], и этот метаболический путь выглядит так:



Альтернативные пути биосинтеза этилена из метионина подробно приведены у Гаспара с соавт. [Gaspar et al., 1985], где показано, что в реакциях образования этилена принимают участие и фенольные соединения. На схеме, представленной авторами, даны пути образования этилена, которые сходны с двумя возможными механизмами генерации этилена в процессах, осуществляемых нейтрофилами (тип лейкоцитов). Последние циркулируют в крови и функционируют как элемент защиты

хозяина от патогенных организмов [Tauber, Babor, 1978]. Кислород-потребляющий бактерицидный механизм нейтрофилов связан с миелопероксидазой, участвующей в обезвреживании бактерий в присутствии перекиси водорода и ионов хлора. Установлено, что в стимулировании нейтрофилов принимает участие этилен. Эти данные представляют немалый интерес, так как указывают на связь между пероксидазой, перекисью водорода и этиленом в процессах защиты от патогенов. Очевидно, именно этилен является основным индуцирующим агентом в цепи направленных на защиту реакций метаболизма.

Есть данные, свидетельствующие о том, что и сама пероксидаза может участвовать в образовании этилена. Так, два очищенных изоэнзима пероксидазы, отличающиеся по своей специфической активности, были исследованы на их этиленобразующую способность (Yang, 1968, цит. по: [Gaspar et al., 1982]). Автором установлено, что при образовании этилена из метионаля С-изоэнзим был более чем в 250 раз активнее по сравнению с изоэнзимом А-І. Доказано, что этилен в тканях яблока синтезируется из метионаля через ряд последовательно идущих реакций, в которых участвует и пероксидаза [Adams, Yang, 1979].

Обработка тканей батата этиленом повышает активность пероксидазы, но ее можно ингибировать циклогексимидом и актиномицином. Эти данные указывают на то, что синтез фермента под действием этилена может идти *de novo*, так как после разделения белков в полиакриламидном геле были идентифицированы две новые зоны с пероксидазной активностью [Gahagan et al., 1968]. Авторы также установили, что частичное увеличение активности пероксидазы, вызываемое старением организма, не связано с влиянием этилена на этот фермент. В то время как циклогексимид и актиномицин D блокировали в наибольшей степени увеличение пероксидазной активности, стимулируемой этиленом, только циклогексимид блокировал процесс старения. Поскольку актиномицин D относительно неэффективен в блокировании процесса старения, полученные данные подтверждают, что сформированная иРНК, ответственная за синтез пероксидазы, может присутствовать в исследуемых тканях и участвовать в синтезе фермента.

Чтобы выяснить действие этилена на активность фермента пероксидазы, Шэннон с соавт. [Shannon et al., 1971] кусочки батата обрабатывали гормоном в концентрации 1 мкл/л и установили, что при этом повышалась не только общая активность фермента, но и активность всех его изоэнзимов, а также содержание радиоактивной метки (^{14}C -лейцина) в них. Используя бластоцидин S, они выяснили, что антибиотик даже в присутствии этилена затормаживал биосинтез пероксидазы и включение ^{14}C -лейцина. Авторы считают, что это служит косвенным доказательством того, что синтез пероксидазы под действием этилена может идти *de novo*.

Сложность в разграничении этих процессов состоит в том, что до сих пор не выяснено, участвует ли пероксидаза непосредственно в синтезе этилена. Изучая превращения 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК) в этилен, было установлено, что ингибиторы пероксидазы не тормозят этот процесс. Не стимулировало образование этилена

и добавление изоэнзимов пероксидазы в исследуемые ткани [Machackova, Zmrhal, 1981].

Сказанное выше говорит о том, что как синтез этилена, так и стимуляция деятельности пероксидазы тесно взаимосвязаны. По всей вероятности, этилен может выступать индуктором синтеза определенных изоэнзимов этого фермента и, возможно, тех, которые активны в стрессовых ситуациях пораженных организмов. Было установлено, что одновременно с образованием локальных повреждений усиливается образование этилена, а также увеличивается его синтез пропорционально числу и размеру некрозов [Loebentein, 1972]. Автор указывает, что экзогенный этилен понижает размножение ВТМ в табаке и снижает количество некрозов на зараженных листьях.

Росс и Вильямсон [Ross, Williamson, 1951] исследовали физиологически активные газы, в том числе этилен, у разных видов растений. Они показали, что газы практически не образуются в интактных листьях здоровых растений *Physalis floridana*, но интенсивно синтезируются, когда растения заражали Y-вирусом картофеля. В листьях с некрозами исследуемые газообразные соединения присутствовали в значительных количествах, и авторы считают, что образование некрозов тесно связано с новообразованием этилена. Среди химических соединений, индуцирующих увеличение активности фермента пероксидазы и одновременно развитие устойчивости, этилен оказался наиболее активным индуктором. Однако действие этилена на изменение активности пероксидазы неоднозначно. Если в растениях батата он стимулировал повышение активности фермента, то в тканях табака и моркови уровень активности пероксидазы мог и не меняться [Birecka et al., 1973; Birecka, Miller, 1974]. Этилен в концентрации 5—80 мкл/л затормаживает удлинение междоузлий у гороха, стимулирует их набухание, но не изменяет существенно активность пероксидазы.

Этилен физиологически очень активен и в концентрации 10^{-6} М оказывает заметное влияние на клетки, удаленные от тех, в которых он синтезируется [Galston, Davies, 1969]. Следовательно, этот гормон может индуцировать активность пероксидазы на значительном расстоянии от мест его синтеза [Gahagan et al., 1968; Simons, Ross, 1971; Saijo, Jakeo, 1974]. Обработка листьев табака этиленом до инокуляции вирусом табачной мозаики ингибирует последующий рост некрозов [Ross, Pritchard, 1972]. Таким образом, индуцируя активность пероксидазы, он ускоряет проявление реакций устойчивости, так как при этом некрозы были существенно меньше и проявлялись быстрее, чем в контроле.

Восприимчивые к заражению растения вырабатывают этилена больше, чем устойчивые [Seever et al., 1971]. Увеличение образования этилена при инфицировании табака сорта Самсун NN происходит на ранних стадиях физиологического состояния, связанного с развитием некротических образований [Balazs et al., 1969, 1977; Nakagaki et al., 1970; Gaborjan et al., 1971]. Прайчард и Росс [Pritchard, Ross, 1975], изучая связь этилена с формированием некрозов, образуемых ВТМ на листьях сверхчувствительного табака сорта Самсун NN, выяснили, что в устойчивых и неустойчивых тканях характер синтеза этилена одина-

ков. Однако инфекция стимулирует более раннее начало его синтеза и он образуется в меньшем количестве в устойчивых тканях. Образование этилена повышается за 8 ч до появления некрозов в устойчивых листьях и лишь за 3 ч до появления некрозов в неустойчивых листьях. Максимум синтеза этилена наступает на 3-й день после заражения устойчивых тканей, но на 4-й после заражения неустойчивых. После этого рост некрозов прекращается. Остановку роста некрозов в устойчивых листьях авторы рассматривают как следствие более ранней инициации биохимических процессов, которые заканчиваются локализацией вируса. Включение защитного механизма осуществляет и свежееобразованный (активный) этилен, который индуцирует освобождение пероксидазы из связанного состояния [Paradies, Elstner, 1980].

Увеличение активности пероксидазы можно индуцировать этиленом, который выделяют корни сладкого картофеля, зараженные черной гнилью [Clare et al., 1966; Stahmann et al., 1966]. В период опыта зараженный материал выдерживался в плотно закрытых контейнерах вблизи от испытуемых растений. Этилен, как газообразное соединение, проникал в ткани растений, помещенных рядом, и стимулировал в них повышение активности фермента, что подчеркивает индуцирующее влияние этилена на активность пероксидазы.

Сравнительно давно выяснено, что синтез этилена ограничивается температурой $+32^{\circ}\text{C}$ [Дженсен, 1968]. Повышение температуры ведет к прекращению синтеза этого соединения. Известно, что при повышении температуры до 32° устойчивые растения теряют способность к локализации вируса и вирус распространяется системно [Weststeijn, 1981, 1984]. Следует выяснить, как связано снижение синтеза этилена с потерей устойчивости при такой же температуре. Этилен, как активный метаболит, оказывает влияние на рост и развитие некрозов, на проявление активности пероксидазы, и, как свидетельствуют многочисленные данные, метаболизм этих соединений тесно взаимосвязан.

3.6. ВИРУСИНДУЦИРОВАННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ

В 1961 г. Росс [Ross, 1961b], работая с растениями, зараженными вирусом табачной мозаики, обнаружил явление приобретенной устойчивости. Автор показал, что в растениях табака сорта Самсун NN и Ксанти нк после заражения нижних листьев вирусом табачной мозаики развивается устойчивость к повторному заражению. Она проявляется в листьях, расположенных выше и ниже инокулированных, а также в участках листовой ткани между некрозами. Этот феномен дал толчок для постановки целого ряда экспериментов, на основе которых многие авторы пытались понять сущность этого естественно приобретенного защитного механизма.

Симонс и Росс [Simons, Ross, 1970, 1971] установили, что при некротическом типе реакции повышается активность пероксидазы в листьях, расположенных над инокулированными, и в них возникает устойчивость, индуцированная вирусом. Они также предположили важную роль фермента в процессе, который определяет размер некроза. Позднее в эту гипотезу было внесено изменение, согласно которому

пероксидаза играет роль не в определении скорости роста некроза, а в образовании «индуцирующего агента», передвигающегося от клетки к клетке и вызывающего состояние устойчивости [Weststeijn, 1976].

Симонс и Росс [1970, 1971] нашли, что в листьях с возникновением приобретенной устойчивости повышается активность пероксидазы, что тесно связано с синтезом и метаболизмом фенольных соединений. В опытах с растениями табака сорта Ксанти нк они установили максимальную устойчивость в незараженной половинке листа на 7-й день после инокуляции противоположной половинки. Активность этого фермента в ней может возрасти в 5 раз по отношению к контрольной на 4—5-й день. В других опытах увеличение активности пероксидазы в верхних листьях зараженных растений табака сорта Ксанти нк и Самсун NN можно было зарегистрировать и до 21-го дня, считая от момента заражения нижних листьев.

Авторы установили также, что после заражения повышается активность каталазы, полифенолоксидазы, аскорбатоксидазы, цитохромоксидазы, аконитазы, дегидрогеназы, фосфогексоизомеразы, но, как правило, активность указанных ферментов резко возрастает в местах проникновения вируса и вокруг них. На значительном расстоянии от некрозов активность многих из перечисленных ферментов равна контролю, а также активность не превышает контроль в верхних листьях, обладающих вирусиндуцированной устойчивостью. При сверхчувствительной реакции растения-хозяина на вирусное поражение может возрастет активность и таких ферментов, как глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, 6-фосфоглюконатдегидрогеназа, фенилаланин-аммиак-лиаза, гидроксилаза 4-коричной кислоты, о-метил-трансфераза кофейной кислоты, рибонуклеаза, кислая фосфатаза [Loop, 1982]. Этот перечень ферментов, повышающих свою активность при вирусном поражении, свидетельствует о том, что начало инфекционного процесса связано с нарушением очень многих метаболических процессов.

Механизм возникновения приобретенной устойчивости не расшифрован. Становится вполне очевидным, что локальная и системная устойчивость обладают определенными различиями, и не только в своем проявлении после заражения устойчивых растений. Так, А. Г. Коваленко [Kovalenko, 1981] пишет, что индуцированная вирусом системная устойчивость табака к ВТМ не имеет прямой связи с процессом локализации вируса. Выяснено также, что локализация вируса без образования некрозов может вызывать развитие приобретенной устойчивости к повторному заражению [Roberts, 1982].

О различиях в сущности проявления механизмов локальной и приобретенной устойчивости свидетельствует и тот факт, что ультрафиолетовое освещение зараженных листьев подавляет локализацию, но не оказывает влияния на развитие приобретенной устойчивости [Chessin, 1982]. А. Г. Коваленко и И. С. Шербатенко [1986] на четырех сортах сверхчувствительных к ВТМ (штамм U₁) растений табака показали, что локализация первичной инфекции и устойчивость листьев к повторному заражению не имеют между собой определенной количественной зависимости.

Интересные исследования по выяснению механизма индуцированной

устойчивости были проведены Штейном с соавт. [Stein, Loebenstein, 1972, 1976; Stein et al., 1985], которые подтверждают присутствие в растительном организме нескольких механизмов защиты от нарушений метаболизма.

3.7. СИНТЕЗ ИЗОЭНЗИМОВ DE NOVO

Б. А. Рубин показал, что распространенной формой реакции растений на заражение является новообразования белков. При заражении увеличивается число полирибосом, стимулируется синтез РНК, наблюдается синтез de novo белков, обладающих иными свойствами, образуются новые изоэнзимы ферментов, изменяются их субстратная специфичность и другие свойства [Рубин, 1969; Рубин, Карташова, 1970; Рубин и др., 1973]. В большинстве работ советских [Рубин, Лушинская, 1969; Ладыгина и др., 1970; Аксенова и др., 1971; Рубин и др., 1975] и зарубежных [Kawashima et al., 1963, 1964; Farkas, Stahmann, 1966] авторов предложение о синтезе de novo пероксидазы в инфицированных тканях получило экспериментальное подтверждение.

Впервые Уритани с соавт. [Uritani, Stahmann, 1961; Kawashima et al., 1963] обнаружили в тканях батата, пораженных черной ножкой, два изоэнзима пероксидазы, отсутствующие в контроле. Появление изоэнзимов обусловлено синтезом ферментов клеткой хозяина, так как сам патоген обладал крайне низкой пероксидазной активностью. Авторы пишут, что новая пероксидаза может быть функционально связана с цитохромной системой, а также играть роль в синтезе фенольных соединений, принимая участие в гидроксилировании бензольного кольца. Увеличение числа изоэнзимов отмечалось в растениях табака, зараженных *Colletotrichum destructivum* [Yu, Hampton, 1964], и в тканях батата, зараженных *Ceratocystis fimbriata* [Weber, Stahmann, 1964]. Факт адаптивного синтеза изоэнзимов с пероксидазной активностью установлен при заражении кукурузы грибом *Ustilago zeae* [Рубин, Лушинская, 1969]. В растениях устойчивого сорта авторы идентифицировали два анодных быстро движущихся белка, окисляющие пирогаллол, но не окисляющие бензидин. В здоровой ткани эти белки отсутствовали. При этом общая пероксидазная активность возрастала в 2—3 раза в растениях, зараженных грибной инфекцией.

При заражении устойчивого и восприимчивого сортов капусты грибом *Botrytis cinerea* в тканях устойчивого сорта идет новообразование РНК и белка с пероксидазной активностью в составе кислых компонентов, у восприимчивого, наоборот, исчезновение двух имеющихся изоэнзимов — по одному в группе кислых и щелочных. Синтез дополнительного изофермента пероксидазы в тканях устойчивого сорта капусты является выражением активной реакции растения на внедрение патогена и не обусловлен ферментом гриба или его токсином. Показано, что фермент из растений устойчивого сорта имеет более сложный изоэнзимный состав (7 изопероксидаз), чем таковой из неустойчивого (3 изопероксидазы). Активность пероксидазы при поражении возрастает в растениях обоих сортов, но сильнее у устойчивого [Аксенова и др., 1968, 1971].

Появление *de novo* изоэнзимов пероксидазы установлено в растениях льна на 15-й день после заражения их *Melampsora lini* [Andreew, Shaw, 1965]. В корнях растений сои, устойчивых к *Phytophthora megasperma* var. *Sojae*, после поражения появляется одна дополнительная полоса белка, а у восприимчивого идентифицированы две новые зоны [Ho, Waever, 1970]. В цветоносах лука, пораженных пероноспорой (*Peronospora schl.*), также определена способность больного растения синтезировать новый белок с пероксидазной активностью [Луковникова и др., 1969]. При этом активность пероксидазы увеличивается по мере усиления степени поражения, но не зависит от общего количества белка, так как не все белковые компоненты обладали этой активностью.

По данным Марайте [Maraite, 1973], у гриба *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, поражающего дыню, присутствует 4 изоэнзима пероксидазы с низкой активностью. Однако в экстрактах из гипокотилей, стеблей, черешков и листьев пораженных растений им обнаружена высокая активность этого фермента по отношению к контролю. После заражения в изоферментном спектре растения-хозяина появляются дополнительные зоны белков с пероксидазной активностью, но с электрофоретической подвижностью, характерной для изоферментов гриба. Появление изоэнзимов пероксидазы при грибном поражении может происходить за счет активирования ферментативной деятельности самого гриба. Одновременно может идти индуцированный синтез изоэнзимов *de novo*, непосредственно не связанных с геномом гриба, а запрограммированных в геноме растения.

Фаркаш и Стаманн [Farkas, Stahmann, 1966] также пытались выявить причины активирования пероксидазы в растениях, инфицированных вирусом южной мозаики фасоли. Было обнаружено, что одновременно с увеличением общей активности фермента в инфицированных листьях появляются две новые пероксидазы, отсутствующие в контроле. Первая появляется на 3-й день после заражения, вторая — на 4-й. Применяв ингибиторы белкового синтеза (пурамицин, актиномицин D, *n*-флуорофенилаланин), они установили, что эти, синтезированные *de novo*, белки проявляют пероксидазную активность. О появлении новых изоэнзимов пероксидазы в инфицированных вирусами листьях *Physalis floridana* Rydb. и *Nicotiana glutinosa* L. сообщается в работе Солимози с соавт. [Solymosy et al., 1967]. С этими данными согласуются результаты Чанта и Бейтса [Chant, Bates, 1970; Bates, Chant, 1970], которые нашли, что при инфицировании *Nicotiana glutinosa* вирусом табачной мозаики или X-вирусом картофеля повышение пероксидазной активности сопровождается изменениями в изоферментном спектре. По данным Е. А. Ладыгиной [1971], заражение растений картофеля вирусом Y вызывает появление дополнительных изоэнзимов пероксидазы в листьях и через месяц после инфицирования. Такие же изменения отмечены и в листьях растений, выращенных из зараженных клубней.

В докладе Стаманна и Демореста на биологическом симпозиуме в Будапеште были представлены данные о влиянии вирусной, грибной и бактериальной инфекции на изменение активности и изоэнзимного спектра пероксидазы [Stahmann, Demozest, 1972]. Авторы отметили, что любое поражение растений приводит к быстрому увеличению актив-

ности фермента и изменению состава его изоэнзимов. При этом некоторые изопероксидазы могут исчезать, а другие синтезироваться *de novo*. Именно эти, синтезированные *de novo*, изоэнзимы определяют изменение активности фермента и проявление устойчивости к действию патогенов.

В этой главе рассмотрены некоторые вопросы защитных реакций, которые имеют место при заражении растений патогенами. В иммунитете живых организмов задействованы многие метаболические системы. При этом стимулируется дыхание, идет синтез «патогенезозависимых» белков и образование лигнина при росте и развитии некрозов. Не последняя роль принадлежит таким метаболитам, как этилен и пероксидаза. Проявление вирусиндуцированной устойчивости сопровождается не только увеличением активности изопероксидаз, но и синтезом некоторых из них *de novo*. Все вместе составляет и определяет тот защитный механизм, «контуры» которого должны в результате усилий многих и многих исследователей дать ключ к пониманию сущности реакций, лежащих в основе выражения иммунного ответа растений.

ГЛАВА 4

ФЕНОЛЫ — СУБСТРАТЫ ФЕРМЕНТА ПЕРОКСИДАЗЫ

4.1. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ МЕТАБОЛИЗМА ФЕНОЛОВ

Большинство ботаников и физиологов второй половины XIX в. склонились к мысли, что образование фенолов в тканях растений является средством для выведения высокоуглеродных компонентов из общего обмена веществ, своего рода экскреторным механизмом. И до сих пор проблема физиологической роли фенольных соединений является сложной и полна противоречий. Однако широкое распространение фенолов во всех важнейших тканях и органах растений свидетельствует о том, что эти соединения не могут быть второстепенными метаболитами растительного организма. Они участвуют практически во всех процессах жизнедеятельности растений, функции и свойства их очень разнообразны и до конца еще не изучены [Биохимия фенольных соединений, 1968; Beart et al., 1985].

Одна из важнейших функций фенолов — участие в окислительно-восстановительных процессах. Палладин высказал предположение, что дыхание растений связано с обратимым окислением и восстановлением некоторых фенольных соединений. Он считал, что акцептором водорода на конечных этапах дыхательного процесса растительных организмов являются окислительные (хинонные) формы фенолов, и назвал их дыхательными хромогенами. Попеременно окисляясь и восстанавливаясь, фенольные соединения (хромогены) служат связующим звеном между водородом дыхательного субстрата и кислородом окружающей среды. В дальнейшем гипотеза Палладина получила поддержку в работах А. И. Опарина, в которых показано, что система хлорогеновая кислота — фенолоксидаза способна окислять такие природные субстраты, как аминокислоты, пептиды и даже некоторые белки [Запрометов, 1974].

Применение изотопной метки позволило установить, что основным местом образования фенольных соединений являются молодые ткани [Запрометов, 1985]. Высокая скорость синтеза при освещении, а также способность изолированных листьев к синтезу фенольных соединений из $^{14}\text{CO}_2$ привели к мысли, что образование фенолов в клетках мезофила идет в хлоропластах. В этих органеллах в процессе фотосинтеза с высокой скоростью образуются полифенолы сравнительно простой структуры, которые затем транспортируются в другие компартменты клетки. Показано, что до 95% общего количества синтезируемых фенолов находится вне хлоропластов.

Исходя из накопленных данных о внутриклеточной локализации ферментов, принимающих участие в биосинтезе фенольных соединений, можно предположить, что, помимо хлоропластов, в клетках имеется еще не менее двух центров образования фенолов [Запрометов, 1985]. Один из них связан с эндоплазматическим ретикулулом (место образования оксикоричных кислот, а также, вероятно, некоторых флавоноидов), а второй — с фракцией частиц, содержащих митохондрии и микротельца (образование *n*-оксibenзойной кислоты). Автор приводит два основных пути биосинтеза фенольных соединений: через шикимовую кислоту (шикиматный) и ацетатно-малонатный. Установлено, что дезаминирование фенилаланина и тирозина, осуществляемое аминк-лиазами, приводит к образованию коричной и *n*-оксикоричной (*n*-кумаровой) кислот соответственно. Из коричной кислоты при помощи гидроксiliрующих (гидроксиллаза коричной кислоты и полифенолоксидаза) и метилирующих (катехол-метилтрансфераза) ферментов далее образуются другие представители этой группы фенольных соединений [Запрометов и др., 1985].

До недавнего времени считалось, что высшие растения способны только синтезировать фенолы, а использование запасенной в них энергии — разрыв ароматических (бензольных) ядер — осуществляется в природе микроорганизмами. Оказалось, что это мнение ошибочно. В 1959 г. М. Н. Запрометов [1974] обнаружил, что введенные в побег чайного листа растения ^{14}C -катехины подвергаются глубокому окислению. После 60—70-часовой экспозиции в темноте до 80% радиоактивности введенных ^{14}C -катехинов может быть обнаружено в составе углекислоты дыхания. Показано также, что гомогенаты листьев чая и виноградной лозы обладают особенностью расщеплять фенолы. У. В. Маргна и Л. Э. Лаанест [1980] пишут, что способность растений расщеплять циклические структуры фенолов до образования CO_2 и простых алифатических метаболитов, по-видимому, универсальна и проявляется в отношении большинства природных мономерных полифенолов. Авторы приводят ряд примеров декарбоксилирования экзо-и эндогенных фенольных соединений и подчеркивают, что метаболизм полифенолов, введенных в растение извне, существенным образом может отличаться от метаболизма этих же соединений в нормальных физиологических условиях.

В работе Гласса приведены данные о влиянии фенольных кислот на механизм поглощения ионов. Выяснено, что бензойные и коричные кислоты ингибируют поглощение ионов фосфора корнями ячменя [Glass, 1973]. Степень ингибирования хорошо коррелировала с способностью фенольных соединений в липидах. Это подтверждает гипотезу

ингибирования посредством изменения свойств мембран [Запрометов и др., 1985]. Работы о нарушении мембранного потенциала и проницаемости мембран под воздействием фенолов представляют интерес, так как обработка бензойной и коричной кислотами приводит к сильному снижению мембранного потенциала [Glass, Dunlop, 1974]. Фенолы способны связывать ионы тяжелых металлов в устойчивые хелатные комплексы, вызывая тем самым детоксикацию последних.

Фенольные соединения проявляют и антиоксидантное действие, которое объясняется двумя обстоятельствами: а) фенолы связывают ионы тяжелых металлов в устойчивые комплексы, тем самым лишая их каталитического действия; б) они служат акцепторами образующихся при аутооксидации свободных радикалов и поэтому способны гасить цепные свободнорадикальные процессы. Окисление лишь одного фенольного соединения может привести к серьезному нарушению деятельности многих ферментных систем.

Способность фенолов к взаимодействию с белками является одним из важнейших свойств этих соединений. Они могут образовывать водородные связи с пептидными группировками белковой молекулы, причем связь осуществляется между фенольной оксигруппой и карбонильным кислородом. Еще в 1929 г. А. И. Опарин и А. Л. Курсанов установили, что в присутствии полифенолов происходит инактивация ряда ферментов [Курсанов, 1952]. Особенно энергично взаимодействуют с белками хинонные формы фенолов. Хиноны, вступая во взаимодействие с тио-, amino- и другими группами белков, могут вызвать их дубление. При работе со срезами клубней картофеля показано, что некоторые фенольные соединения (гесперидин, нарингенин и их гликозиды, а также флоризин) тормозят синтез белков. Однако салициловая, *o*-кумаровая и *n*-оксibenзойная кислоты гипокотилей конских бобов могут стимулировать синтез белка на 30—50% [Запрометов, 1974].

Биологическое действие фенольных соединений в клетке обусловлено строением их молекул и физико-химическими свойствами. Это, во-первых, способность к легкой ступенчатой отдаче электронов, во-вторых, наличие фенольных гидроксильных групп, которые являются весьма реакционноспособными [Барабой, 1984]. Такая активность играет важную роль при заражении патогенами. В инфицированных растениях активированный кислород может быть посредником в противомикробном действии растительных фенолов, так как некоторые из них способны генерировать супероксидные радикалы [Аверьянов, Лапинова, 1984; Аверьянов, Исмаилов, 1986]. Исследователями выяснено участие этих радикалов в механизме токсического действия фенольных соединений и приведены сведения о том, что радикалы кислорода способны выступать как факторы фитоиммунитета. Известно, что фенольным соединениям свойственно гасить цепные реакции метаболизма, запускаемые свободными радикалами, и в этом одна из важнейших их функций.

Таким образом, все изложенное выше отрицает взгляд на фенолы лишь как на некие конечные продукты обмена веществ или «отходы» метаболизма растений. Разнообразие фенолов вполне соответствует их роли в процессах роста, обмена веществ, избирательного поглощения лучей солнца, в выполнении структурной, опорной и защитной функций.

4.2. НЕКРОЗОГЕНЕЗ И ЕГО ПРОЯВЛЕНИЕ

Фаркаш и Кирали [Farkas, Kiraly, 1962], выясняя роль окислительного метаболизма клетки в образовании некрозов, нашли, что активация полифенолоксидазы и пероксидазы в местах проникновения вируса приводит к накоплению большого количества продуктов окисления фенолов-хинонов, которое приводит к гибели клеток. В этом процессе пероксидаза и полифенолоксидаза регулируют отношение окисленной и восстановленной форм фенолов и тем самым определяют реакцию хозяина на вирусное поражение. В составе «некротического валика», где отмершие клетки граничат с живыми, найден хинон-белковый комплекс.

Исследования, проведенные Мартином и Галетом [Martin, Gallet, 1966], показали, что прекращение размножения вируса у сверхчувствительного табака сорта Ксанти нк, инфицированного ВТМ, обусловлено не барьером из мертвых клеток, изолирующих инфекционную РНК в ограниченной зоне хозяина, а каким-то другим процессом. С помощью электронного микроскопа было установлено, что в клетках, соседствующих с некротическими поражениями, не обнаруживаются полные вирусные частицы, если температура окружающей среды равна 20° [Martin et al., 1969]. При переходе к повышенной температуре появляются вполне сформированные вирусные частицы. Тонги [Tanguy, 1971] показал, что после проявления некрозов накопление фенольных соединений в зоне некроза начинает снижаться. Уже через 48 ч в условиях с температурой 30° происходит снижение содержания хлорогеновых кислот, рутина и никотинфлорина. Очень резко уменьшается содержание *п*-кумаровой и ферулилхинной кислот, быстро исчезают скополетин и феруллил-2-глюкоза.

Эти данные свидетельствуют о том, что повышение температуры приводит к существенным изменениям в синтезе фенолов. Очевидно, с повышением температуры увеличивается и каталитическая деятельность ряда ферментов, в результате чего идет более быстрая утилизация фенольных соединений. Возвращение растений табака сорта Ксанти нк, зараженных ВТМ, в условиях с температурой 20° приводит к тому, что содержание флавонозидов возрастает на 30%, а хлорогеновых кислот — на 40% по отношению к контролю. Автор считает, что стимуляция синтеза фенольных соединений в листьях растений Ксати нк, покрытых некрозами, есть результат активации реакций глюкозидизации, метилирования и *о*-гидроксилирования этих соединений. Аккумуляция фенолов в форме глюкозидов и эфиров глюкозы может осуществляться ферментными системами, использующими в качестве донора глюкозы уридиндифосфатглюкозу [Cogler, Swain, 1965; Tanguy, 1971].

Многими авторами показано, что образование локальных некротических поражений сопровождается также стимуляцией реакций метилирования, при этом синтезируются производные скополетина, ферулиловой, синаповой и ванильной кислот (Finnle, Nelson, 1963a,b; Hess, 1964, 1965, цит. по: [Tanguy, 1971]). Это должно являться следствием активирования метилтрансферазы. По-видимому, этот фермент обеспечивает переход метильной группы в форме *S*-аденозилметионина. Проанализировав свои

и данные других авторов, Тонги [Tanguy, 1971] приходит к выводу, что фенольные соединения не несут ответственности за образование некрозов и за реакцию сверхчувствительности. Синтез фенолов стимулируется только вследствие вторичных эффектов вирусного заражения. Далее автор пишет, что если фенольные соединения нельзя рассматривать как непосредственных участников блокирования репликации вирусной РНК, то возможно, что ингибирование синтеза или активности РНК-репликаз связано с окислительным циклом фосфопентоз, а аккумуляция фенолов является только следствием стимулирования этого процесса.

Комплекс полифенолоксидазы — фенолы-хиноны — пероксидазы, присутствующий в клетках высших растений, составляет один из активных физиологических механизмов, участвующих в защите растений от поражений. Точно не установлено (за исключением изоэнзима C_2 , см. 2.5), какие из изопероксидаз, активизируются в месте образования некрозов у растений, зараженных вирусами. Некрозогенез ассоциируется с аккумуляцией полифенолов, окисляющихся до хинонов, и, как считает Лоебенштейн [Loebenstein, 1972], быстрая аккумуляция хинонов, в свою очередь, служит медиатором для действия ферментов.

Анализ накопленных данных дает основание разделить процессы, в которых участвуют, с одной стороны, фенилаланин-аммиак-лиаза и полифенолоксидазы, а с другой — пероксидазы. Известна способность растительных фенольных соединений угнетать активность большинства оксидаз, исключение составляет только пероксидаза. Если активирование первых в растениях, зараженных вирусами, тесно связано с ростом некроза и суровостью поражения, то повышение активности пероксидазы не имеет прямой коррелятивной зависимости от этого процесса. Активность фенилаланин-аммиак-лиазы, число некрозов и время их появления так взаимосвязаны, что фермент может служить маркером этого процесса [Paynot et al., 1973a,b]. Следует отметить также, что у сверхчувствительных растений табака, содержащих ген N, активность фенилаланин-аммиак-лиазы повышена и при перенесении зараженных растений в помещение с температурой 35°. В этих условиях образование некрозов прекращается и реакция таких растений на заражение вирусом становится системной, а активность фенилаланин-аммиак-лиазы остается высокой и при изменении температуры окружающей среды.

Фритиг и др. [Fritig et al., 1976] отмечают, что заражение вирусом табачной мозаики растений табака сорта Самсун NN приводит к существенному нарушению в биосинтезе фенольных соединений, производных L-фенилаланина. А регулируются эти реакции при обязательном участии фенилаланин-аммиак-лиазы, как ключевого фермента в биосинтезе фенолов. Увеличение активности этого фермента наблюдали до и параллельно с развитием некрозов [Paynot et al., 1971, 1973a,b; Duchesne et al., 1977], однако не далее 6 мм от края некроза. На более удаленном расстоянии активность фермента равна контролю.

Интересно отметить, что, если обработать инфицированные ткани фенилаланином, размер некроза увеличится. В данном случае фенилаланин или является предшественником в синтезе необходимых соединений, или эта аминокислота инициирует образование фенилаланин-аммиак-лиазы [Walton, 1968] и синтез фенолов. Показано, что в живых клетках

табака сорта Ксанти NN вокруг местных некрозов, вызванных заражением ВТМ, накапливаются дериваты фенолов — ароматические амиды (ферулилпутресцин, кумарилпутресцин и др.), обладающие сильными ингибиторными свойствами. В клеточных стенках образуются новые гликопротеины, отсутствующие в интактных клетках, а продукты метаболизма гликопротеинов могут нарушать транспорт вирионов в соседние клетки.

4.3. ЗАЩИТНЫЕ ФУНКЦИИ ФЕНОЛОВ

Так как метаболизм пероксидазы и фенольных соединений тесно взаимосвязан, то повышение активности фермента должно отражать и изменения в метаболизме его субстратов — соединений фенольной природы. В настоящее время в литературе недостаточно данных о содержании и превращениях фенолов в растениях, обладающих устойчивостью к вирусному поражению. В большинстве работ изменения в содержании фенольных соединений авторы связывают с процессом лигнификации, объясняя этим способность растений к защите от проникновения и распространения патогенов. Очень много работ посвящено изучению механизма активной защиты растений от поражения их грибами [Метлицкий и др., 1972; Метлицкий, Озерецковская, 1981; Nakajima et al., 1975; Sohi, Raval, 1983; Harms, Terbea, 1984; Malmberg, Theander, 1984; Ando et al., 1984; Arora, Bajaj, 1985, и др.]. Взаимодействие различных микроорганизмов с растениями-хозяевами имеет свою специфику, и поэтому не всегда данные, полученные для системы хозяин—гриб, можно прямо переносить и интерпретировать по отношению к растениям, пораженным вирусными заболеваниями.

Анализ работ, в которых приводятся данные о содержании фенолов в листьях растений табака, зараженных вирусами, не дает возможности сделать определенные выводы. В исследованиях авторов использованы различные методы определения, приводятся данные о содержании разных фенолов: хлорогеновой кислоты, *о*-и дифенолов, пропаноидов, флюоресцирующих фенолов, об общем их содержании и т. д. Опыты, описанные в статьях, выполнены в различные сроки вегетации [Hampton, 1970; Tanguy, 1971; Fritig et al., 1972; Edreva, 1974; Legrand et al., 1976, 1978]. Все перечисленное создает определенные трудности в использовании имеющихся данных. Повсеместное присутствие фенолов в тканях растений свидетельствует о том, что они участвуют во многих метаболических процессах, в том числе и в защитных реакциях: выполнении фенолами пассивной барьерной функции (лигнин), активном отпугивании насекомых (фитонциды, фитоалексины) и других формах защиты растений от патогенов.

Наиболее важной функцией фенолов является их взаимодействие с белковыми молекулами [Srivastava, Huystee, 1977 a,b]. Особенно активно с белками взаимодействуют хинонные формы фенольных соединений, чаще, в местах доступных сульфгидрильных и других групп [Cirstea et al., 1980]. Так, *о*-хиноны обладают наибольшей реакционной способностью в отношении NH_2 -и SH -групп белков вирусов. Ряд авторов предполагают, что окисленные фенолы могут непосредственно влиять

на вирионы, образуя устойчивые комплексы с капсидным белком [Mink, Saksepa, 1971; Saksepa, Mink, 1970; Hampton, 1970]. Показано прямое действие фенолов-хинонов на вирусные частицы в момент их «активного» состояния [Piegron et al., 1977]. Среди фенолов, способных связываться с белком вирионов, выделяется хлорогеновая кислота, и в этом отношении интересна работа Боярских [Bijarski, 1980], в которой приводится структура аддукта хлорогеновой кислоты с аминокислотой лизина, входящего в состав капсидного белка вируса.

Избыток хинонов ведет к связыванию их с аминокислотами лизина и аспарагиновой кислоты ферментов, что вызывает подавление ферментативной активности. Фенольные соединения, легко взаимодействуя с белками, могут быть аллостерическими эффекторами ферментных процессов. Показано, что конкурентоспособное взаимодействие белков и флавоноидов сильно зависит от свободного фонда фенилаланина, являющегося общим источником синтеза белков и фенолов [Маргина, 1980].

Как пишут У. В. Маргина, Л. Э. Лаанест [1980] и М. Н. Запрометов [1985], фенольные соединения в растительной клетке претерпевают значительные катаболические превращения. Это следует иметь в виду, когда речь идет о данных, получаемых для растений, пораженных вирусной инфекцией. После проникновения вируса в клетки могут накапливаться отдельные формы фенольных соединений или продукты их окисления, а затем идут «вторичные» процессы, что приводит к изменению общего пула предшественников и в итоге к снижению или увеличению синтеза отдельных фенолов. Большой теоретический и практический интерес представляет вопрос о возможной доле участия индивидуальных соединений этого класса в образовании некрозов, связывании белков вирусов, возникновении и проявлении системной вирусиндуцированной устойчивости растений.

4.4. СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛОВ В РАСТЕНИЯХ ТАБАКА

Пероксидаза — главная оксидаза в окислении фенольных соединений различной природы, и этим объясняется внимание исследователей к содержанию ее субстратов в пораженных растениях. Нами было проведено определение общего содержания фенолов в листьях двух устойчивых к ВТМ (Ксанти нк и Самсун 47/10 нк) и одного восприимчивого (Самсун системный) сортов растений табака. Исследовали листья верхнего (12—16 см по средней жилке), среднего и нижнего ярусов. В опыте нижние листья заражали вирусом табачной мозаики. Контроль — листья того же яруса идентичных здоровых растений. Листья определенного яруса от 5—10 растений отбирались в среднюю пробу на 2, 5, 7 и 10-й день после заражения. Фенольные соединения извлекали по общепринятым методикам [Ксендзова, 1971]. Об относительном содержании фенольных соединений судили после предварительного просмотра экстрактов при различных длинах волн — 290, 325, 340 нм, соответствующих длинам волн поглощения кофейной, хлорогеновой кислот и скополетина. Определение общего содержания фенолов проводили параллельно по двум методам: либо по Арноу и Фолину—Чокальте, либо

Таблица 1

Поглощение спирторастворимых фенолов, выделенных из листьев табака сорта Самсун 47/10 нк, при разных длинах волн

Ярус листьев	День после заражения	290 нм		325 нм		340 нм	
		Здоровые	Зараженные	Здоровые	Зараженные	Здоровые	Зараженные
Верхний	2-й	0,88	0,47	1,03	0,47	0,85	0,38
Нижний	2-й	0,87	0,61	0,94	0,65	0,77	0,53
Верхний	5-й	1,03	0,79	1,05	0,75	0,87	0,61

по Арноу и Фолину—Дениса [Запрометов, 1974; Johnson, Scahl, 1957; Jeppings, 1981]. Для количественного выражения полученных данных строили калибровочные кривые по хлорогеновой кислоте.

Прямое спектрофотометрирование приготовленных экстрактов дает первую информацию о содержании фенольных соединений в листьях сравниваемых растений. Показания спектрофотометра при 325 нм (табл. 1) можно использовать как скрининг-метод для общей характеристики содержания фенолов, так как эта длина волны соответствует максимуму поглощения хлорогеновой кислоты, преобладающей в растении табака. Именно этот метаболит играет немалую роль в устойчивости картофеля к фитофторозу [Метлицкий, Озерцовская, 1985].

Содержание фенолов после заражения устойчивых и восприимчивых к ВТМ растений табака сорта Самсун снижается на 30—40% по отношению к контролю. Это отмечено уже через два дня после заражения в листьях верхнего яруса и в нижних листьях, на которые наносился инокулюм (табл. 1, 2). Данные табл. 2. свидетельствуют о том, что в листьях верхнего яруса растений устойчивого к ВТМ сорта табака Самсун 47/10 нк на ранних этапах патогенеза происходит снижение содержания фенольных соединений. В нижних листьях растений этого сорта после заражения идет интенсивный процесс некрозообразования. Однако мы не обнаружили накопления фенольных соединений в этих листьях ни на 2-й, ни на 5-й день после заражения вирусом. Как считает А. С. Вечер [1984], репрессия синтеза фенолов может наблюдаться лишь при достаточно высокой концентрации репрессирующих веществ. Однако в литературе нет сведений о веществах, подавляющих синтез фенолов в инфицированных растениях. Нами было обнаружено, что накопление фенолов в нижних листьях этого сорта происходит лишь на 7-й день после заражения (см. табл. 2) и превышает контроль более чем на 50%. В это время нижние листья растений табака устойчивого сорта Самсун 47/10 нк поражены некрозами и уже начинают отмирать, поэтому увеличение фенолов в них не может быть связано с защитной функцией, а скорее есть результат деградации клеток некротической зоны.

Сдвиг присущего живым клеткам синтеза фенольных соединений в сторону их уменьшения — результат влияния вирусной инфекции. Это подтверждается данными, полученными для молодых листьев вирозных растений. Так, на 10-й день после заражения ВТМ в молодых, отрастаю-

Таблица 2

Содержание фенолов (в мг/г сырой ткани) в листьях верхнего и нижнего ярусов табака сорта Самсун 47/10 нк, здоровых и зараженных ВТМ

Ярус листьев	День после заражения	По Арноу		По Фолину—Чокальте * и Фолину—Дениса **	
		Здоровые	Зараженные	Здоровые	Зараженные
Верхний	2-й	0,41	0,24	0,14*	0,08
Нижний	2-й	0,91	0,75	0,38*	0,29
	5-й	0,56	0,50	0,32*	0,30
Верхний	5-й	0,32	0,19	1,70**	1,60
	7-й	0,54	0,38	1,13**	0,90
Нижний	7-й	0,87	1,31	0,90**	1,53
Верхний	10-й	0,76	0,49	1,15**	0,87

щих листьях, имеющих длину листовой пластинки 12—16 см, как для устойчивого (см. табл. 2), так и для неустойчивого (табл. 3) сорта содержание фенолов было пониженным по отношению к их содержанию в листьях здоровых растений. Анализ данных указанных таблиц дает основание предполагать, что в течение 10 дней инфекционного процесса в молодых листьях происходит снижение синтеза фенольных соединений, которое должно быть связанным с изменением состояния растения в целом. Данные табл. 3 показывают, что в листьях растений табака сорта Самсун (сист.), неустойчивого к ВТМ, снижено содержание фенолов в листьях всех ярусов исследуемых инфицированных растений.

Сравнительный анализ содержания фенольных соединений, которые были определены по трем разным методам, показал, что данные, полученные по методу Фолина—Чокальте, несколько занижены, а полученные по Фолину—Дениса завышены по отношению к данным, полученным по методу Арноу (см. табл. 2). Результаты, полученные по методу Арноу, занимают промежуточное положение среди данных сравниваемых методов, поэтому в дальнейшем определение содержания фенолов проводили этим методом. Таким образом, было исследовано содержание спиртоводорастворимых фенольных соединений и установлено, что вирусная инфекция обуславливает снижение содержания фенолов в листьях разных ярусов растений табака сорта Самсун устойчивого и восприимчивого к вирусу табачной мозаики.

Растения табака сорта Ксанти нк, так же как и растения сорта Самсун 47/10 нк, в ответ на заражение ВТМ образуют некрозы в местах проникновения вируса и проявляют системную устойчивость в листьях, расположенных над зараженными. С развитием инфекционного процесса многие авторы связывают и накопление фенольных соединений [Kosuge, 1969; Steijnberg et al., 1983; Harms, Terbea, 1984]. Тем не менее, как свидетельствуют данные табл. 2, в нижних листьях растений табака сорта Самсун 47/10 нк даже в присутствии некрозов фенолы накапливаются только на 7-й день после заражения. В остальных исследуемых листьях содержание фенолов было ниже контроля. Однако в листьях

Т а б л и ц а 3

Содержание фенолов (в мг/г сырой ткани) в листьях здоровых и зараженных ВТМ растений табака сорта Самсун (сист.)

Ярус листьев	День после заражения	По Арноу	
		Здоровые	Зараженные
Верхний	5-й	1,50	0,84
Нижний	5-й	2,00	1,55
Верхний	10-й	1,18	0,78
Средний	10-й	1,37	0,92
	10-й*	0,91*	0,75*

* Данные для Самсун 47/10 нк.

Т а б л и ц а 4

Содержание фенолов (мг/г сырой ткани) в листьях здоровых и зараженных ВТМ растений табака сорта Ксанти нк

Ярус листьев	День после заражения	По Арноу	
		Здоровые	Зараженные
Верхний (10 см)	5-й	2,16	2,50
	7-й	0,90	1,20
	10-й	2,00	2,50
Верхний (16 см)	2-й	1,55	1,93
	5-й	0,46	0,57
	7-й	0,53	0,83
	10-й	0,90	0,92
Средний	5-й	1,27	1,55
	10-й	0,90	1,58
Сразу над зараженными	7-й	0,66	0,91
	10-й	1,36	1,60
Нижний, с некрозами	2-й	2,13	1,81
	5-й	2,05	1,36
	7-й	1,57	2,63

растений табака сорта Ксанти нк с таким же типом реакции на ВТМ было обнаружено накопление фенольных соединений почти во всех анализируемых листьях инфицированных растений (табл. 4). Исключение составляли только инокулированные листья в начале инфекционного процесса, на 2-й и 5-й день после заражения, в которых содержание фенолов было ниже, чем в здоровых листьях. Следовательно, в нижних зараженных листьях растений этого сорта вначале идет снижение уровня синтеза фенолов, а затем и в нижних (7-й день), и во всех вышележащих листьях синтез фенольных соединений повышается.

Сравнение содержания фенолов в листьях разных ярусов растений двух сортов табака — Ксанти нк и Самсун 47/10 нк, образующих некрозы

в ответ на заражение ВТМ, выявило различное количество фенольных соединений в исследуемых листьях. Таким образом, даже образование некрозов в нижних инфицированных листьях не является определяющей первопричиной изменения содержания фенолов. Какие же процессы определяют эти изменения, если разные сорта табака даже одного вида растений по-разному реагируют на вирусное поражение? Возможно, основной причиной является изменение синтеза предшественников фенольных соединений, метаболизм которых для вирозных растений практически не изучен. Этот факт усугубляется еще и тем, что не выяснены пути изменения обмена фенолов в самом начале инфекционного процесса, в первые часы после заражения. Для растений, пораженных вирусной инфекцией, вопрос об участии фенолов в защитном механизме требует дальнейших исследований.

4.5. БЕНЗОЙНАЯ КИСЛОТА ПРИ ЗАРАЖЕНИИ

Изучая изменения активности пероксидазы при развитии и течении защитных процессов, необходимо знать и содержание ее индивидуальных субстратов. Накопленные к настоящему времени данные по общему содержанию фенольных соединений в растениях, зараженных вирусами, не полные и часто несопоставимы для обсуждения.

Методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) проведено изучение количественного содержания отдельных фенольных соединений в растениях табака сорта Ксанти нк. Исследуемые пробы для ГЖХ готовили по стандартным методикам. Исследования проводили на газожидкостном хроматографе японского производства марки «G-5A» фирмы Shimadzu. При сравнительном анализе экстрактов из листьев здоровых и вирозных (ВТМ) растений было испытано 20 различных субстратов. Оказалось, что наиболее интересные данные получены для *п*-оксибензойной кислоты. Ее присутствие в листьях исследуемых растений подтверждено методом хромато-масс-спектропии (ГЖ масс-спектрометр марки 9000 S ЛКБ, Швеция). Содержание этой кислоты в листьях, обладающих вирусиндуцированной системной устойчивостью, было значительно выше, чем в контроле (табл. 5). Так, в листьях инфицированных растений на 5-й день после заражения бензойной кислоты было почти в 2 раза больше, чем в листьях здоровых растений. В нижних листьях тех же растений количество бензойной кислоты было в 4 раза выше по сравнению с контрольными листьями.

Такое изменение в синтезе этой кислоты в зараженном растении вызывает определенный интерес. Через 7 дней после заражения в верхних, растущих листьях исследуемых растений содержание бензойной кислоты было также значительно выше, чем в здоровых листьях. В верхних листьях, обладающих вирусиндуцированной системной устойчивостью, в 2 раза повышается активность анионных изоэнзимов фермента пероксидазы [Андреева, 1981] и параллельно с этим в 1,8—2,9 раза возрастает содержание *п*-оксибензойной кислоты. Бензойная кислота является фиталексином и, следовательно, вполне может быть индуктором деятельности пероксидазы. Повышенное содержание бензойной кислоты в верхних листьях растений табака, инокулированных ВТМ, должно быть связано

Таблица 5

Содержание бензойной кислоты (в %) в здоровых и зараженных ВТМ листьях табака сорта Ксанти нк

Растения	День после заражения		
	5-й	7-й	5-й
	Верхние		Нижние
Инфицированные	16,2	28,8	8,0
Здоровые (контроль)	8,9	9,9	2,0
Инфицированные/Здоровые	1,8	2,9	4,0

с деятельностью анионных изоэнзимов фермента, так как одно соединение является субстратом, а другое катализирует его окисление. И оба эти соединения, очевидно, активны в физиологическом процессе, тесно связанном с проявлением приобретенной устойчивости.

Бензойная кислота обладает фунгицидным действием [Brown, Swinburne, 1971]. Так, Хармс [Harms, 1984] установил, что на 5-й день после заражения грибной инфекцией идет синтез de novo оксibenзойных и оксикоричных кислот, обусловленный увеличением активности фенилаланин-аммиак-лиазы. В составе оксibenзойных кислот преобладали феруловая и *n*-кумаровая кислоты, содержание которых составляло 180% от контроля. Синтез бензойной кислоты идет через шикимовую кислоту или в результате β -окисления соответствующих коричных кислот [Запрометов, 1974]. Автор пишет, что *n*-оксibenзойная кислота на 30—50% стимулирует синтез белковых молекул. Установлено также, что обработка тканей бензойной и коричной кислотами приводит к сильному снижению мембранного потенциала [Glass, Dunlop, 1974]. Это подтверждает взаимосвязанный метаболизм бензойной и коричной кислот.

Рядом авторов было выяснено, что бензойная и полиакриловая кислоты могут индуцировать образование интерферонов у животных и так называемых *в*-белков, найденных вокруг локальных некрозов у растений, зараженных вирусами [Gianinazzi et al., 1980; Matsuoka, Ohashi, 1984, 1986]. Известно, что ткани, окружающие некроз, проявляют сильное ингибирующее действие на вирусы; накапливаясь в значительных количествах, *n*-оксibenзойная кислота может быть индуктором устойчивости [White, 1979].

Установленное нами увеличение содержания *n*-оксibenзойной кислоты, как в нижних инфицированных листьях, так и в верхних, где отсутствуют вирусные частицы, свидетельствует об активной функции этого соединения в метаболизме инфицированных растений табака.

ПЕРОКСИДАЗЫ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ И ДУРМАНА

5.1. АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Изменения, происходящие в клетках растений, при нарушении метаболизма захватывают все центры метаболической активности, включая митохондрии, пластиды, рибосомы и ядерный аппарат. Как в органеллах, так и в цитоплазме наиболее значительным изменениям подвергаются ферменты, и в частности пероксидаза, активность и спектр которой меняются под действием биологических и небιологических агентов. Так, при обработке растений батата этиленом активность фермента возрастает в листьях и запасающих органах [Hidemasa, 1970; Shanon et al., 1971]. Повышается активность пероксидазы в листьях фасоли, обработанных 0,15 М раствором пипеколиновой кислоты [Dezsi et al., 1971].

Изменения физиологического состояния растений также приводят к повышению активности пероксидазы [Roberts, 1969; Borris, 1972]. В ответ на воздействие солями отмечены как активация фермента, так и качественные изменения в спектре белков [Чиркова и др., 1973; Молоков и др., 1973], а также показано, что при недостатке кислорода увеличивается интенсивность работы фермента и существенно меняется состав анодных изоэнзимов. Приводятся данные о значительном увеличении пероксидазной активности при водном дефиците. Обезвоживание сопровождается не только повышением активности пероксидазы цитоплазмы и хлоропластов, но и изменением их изоферментного состава [Алексеева, Рамазанова, 1973а, б]. Под влиянием низких температур в листьях озимой ржи возрастает активность фермента и наиболее активными оказываются анодные фракции [Сулейманов и др., 1972]. Авторы связывают активацию оксидазной функции пероксидазы с важной ролью этого фермента в аэробном дыхании озимых культур в зимнее время. Отмечено повышение активности фермента и при механических повреждениях [Андреева, Воронова, 1980, 1981], при поранении клубней батата [Kawashima et al., 1963], ткани листьев фасоли [König, Nienhaus, 1970], при срезании листьев табака и ячменя [Lazar, Farkas, 1970].

Активность фермента меняется также в процессе естественного старения. Изучая изменчивость изоферментов, в том числе пероксидазы, в покоящихся, прорастающих и «стареющих» тканях картофеля, В. Яаска и В. Яаска [1971] установили, что на электрофореграммах «стареющих» тканей первыми выявляются и оказываются наиболее интенсивными быстро движущиеся к аноду изоэнзимы. Новацкий и Хемптон [Novascku, Hampson, 1968], определив в растениях табака 5 быстро и 4 медленно движущихся изоэнзима пероксидазы, обнаружили, что при старении как в целых листьях, так и в листовых дисках повышалась активность в группе быстро движущихся изоформ. У «стареющих» интактных листьев табака и ячменя также обнаружено увеличение активности пероксидазы

[Lazar, Farkas, 1970]. Е. В. Будилова с соавт. [1971] отмечают, что активность пероксидазы в старых, погруженных в воду листьях кубышки всегда выше, чем в молодых. Практически все сколько-нибудь существенные воздействия извне и внутренние нарушения метаболизма растения сопровождаются изменением активности или изоферментного спектра пероксидазы.

5.2. ПОВЫШЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА ПРИ ГРИБНОЙ И ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

О влиянии грибной, бактериальной и вирусной инфекций на изменение активности пероксидазы сообщается в целом ряде работ [Луконникова и др., 1969; Рубин, 1966, 1969; Klusak, 1970; Ho, Waever, 1970; Grzelinska, 1970; Hofferek, Wolfgang, 1975; Sridhar, 1978; Hammer-schmidt et al., 1982; Groza, Olteanu, 1982; Reuveni, Bothma, 1985]. При этом следует отметить, что грибы и бактерии имеют собственные ферментные системы, подвижность их изоэнзимов может быть сходной с электрофоретической подвижностью ферментов хозяина. Так, Едрева [Edreva, 1972], исследуя состав изоэнзимов пероксидазы *Pegonospora tabacina* и ее хозяина *Nicotiana tabacum*, установила, что все 10 изопероксидаз паразита имеют такую же или очень близкую электрофоретическую подвижность, как и изоэнзимы пероксидазы табака.

Различные по устойчивости сорта растений по-разному реагируют на инфекцию. Резкое повышение оксидазной активности пероксидазы в зараженных тканях устойчивого сорта капусты приводит к накоплению в них продуктов окисления флороглюцина, которые обладают четко выраженным фунгицидным действием и поэтому создают на пути инфекции химический барьер. Однако в тканях неустойчивого сорта такого ответа на инфекцию не наблюдалось [Аксенова и др., 1971]. В листьях разных сортов пшеницы, устойчивых и восприимчивых к стеблевой ржавчине, при заражении повышается активность и изменяется спектр пероксидазы [Seever et al., 1971]. Особенно значительно активируются изоэнзимы, занимающие 5, 6, 9 и 10-е положение после разделения в полиакриламидном геле. Активность изопероксидаз устойчивых сортов была много выше, чем неустойчивых. Так, например, активность 9-го изоэнзима пероксидазы устойчивого сорта возросла после заражения на 300%, тогда как восприимчивого — лишь на 50%.

Повышение активности пероксидазы при грибной и бактериальной инфекции, по мнению некоторых исследователей, есть следствие повреждения и деградации инфицированных клеток, и коррелирует оно со степенью проявления симптомов заболевания [Novacky, Hampton, 1968; Рубин и др., 1973; Рубин, 1975; Shirata et al., 1978]. Это не исключает возможности существования других механизмов участия пероксидазы в проявлении устойчивости, связанных, например, с непосредственным воздействием фермента на внедрение паразита, о чем говорилось выше (см. 3.2). Считается, что этот фермент влияет на проницаемость клеточных мембран путем окисления тирозиновых остатков белка оболочки патогена, препятствуя таким образом его внедрению в ткань.

Б. А. Рубин с соавт. [1973, 1975] предполагают, что активация

пероксидазы в тканях растений, инфицированных грибами, может происходить, во-первых, за счет пероксидазы, синтезируемой самим паразитом, во-вторых, за счет активации имеющихся в клетке изопероксидаз. Такое активирование вызвано либо воздействием различных соединений, образуемых патогеном или клеткой растения под влиянием инфекции, либо изменением физико-химического состояния самого белка фермента. Третий источник увеличения активности пероксидазы — синтез изоэнзимов в клетках растения *de novo*, о чем уже было сказано (см. 3.7).

Взаимодействие растений-хозяев и вирусов происходит иначе, чем при заражении растений грибами и бактериями, так как у вирусов нет собственных ферментативных систем. Для всех метаболических процессов и построения себе подобных частиц вирус использует пластический материал хозяина. Это взаимодействие зависит от устойчивости клеток растений и не является чем-то неизменным. Один и тот же вирус может вызывать различную реакцию у разных хозяев [Novacky, Hampton, 1968; Bell, 1981, и др.]. Развитие вирусной инфекции приводит к изменению активности окислительно-восстановительных ферментов в растениях как с местной, так и с системной реакцией на заражение [Wood, 1971; Loop, 1976b, 1979; Conti et al., 1982; Harrison, 1982].

Исследуя действие разных штаммов ВТМ на растения табака, Б. А. Рубин и И. В. Зеленева [1964] обнаружили, что активность пероксидазы была повышена на протяжении всего опыта при заражении каждым из трех штаммов, но наиболее сильную активацию фермента вызывал подорожниковый штамм. Так, в листьях огурца, зараженных вирусом огуречной мозаики, активность пероксидазы резко увеличивалась и на 8-й день составляла 430% по отношению к контролю, а на 25-й — около 850%. Увеличение активности пероксидазы часто связывают с образованием токсических соединений, обуславливающих раннюю гибель инфицированных клеток, что препятствует распространению вируса [Коваленко, 1983; Schuster, Flemming, 1976]. В основе этих процессов лежит превращение фенолов до хинонов, обладающих токсическим эффектом. Усиление активности пероксидазы коррелирует с системно приобретенной устойчивостью табака сорта Самсун NN к вирусу табачной мозаики [Simons, Ross, 1970, 1971; Loop, 1976b].

Количественные изменения активности, появление новых компонентов в составе изопероксидаз при заражении растений вирусами позволяют предполагать особую физиологическую роль отдельных изоэнзимов пероксидазы в метаболизме растений, зараженных вирусами. Особенности развития местных некрозов и устойчивости у разных растений зависят как от генетической основы хозяина, так и от реализации в них информации, закодированной в вирусной нуклеиновой кислоте.

5.3. АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ И ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗЫ В ЛИСТЬЯХ КАРТОФЕЛЯ, ЗАРАЖЕННОГО ВИРУСОМ L

Изучение спектров и активности различных белков растений-хозяев, пораженных вирусами, показало существенные качественные и количественные изменения в их составе, имеющие место на протяжении всего процесса патогенеза [Андреева и др., 1973; Андреева, Омель-

ченко, 1976, 1981]. Установлено, что вирус как индуцирует, так и ингибирует либо синтез, либо активность изоэнзимов ферментных белков — пероксидазы и полифенолоксидазы. Увеличение активности полифенолоксидазы иногда соотносят с активированием изоэнзимов пероксидазы [Ладыгина и др., 1970; Лисицина, Рахимбаев, 1974; Tripathi, Verma, 1975; Vegetti et al., 1975], так как *in vitro* эти два фермента могут проявлять перекрывающуюся субстратную специфичность. Однако нет оснований считать, что все обстоит аналогично и *in vivo*. К тому же сведений о взаимосвязанном действии пероксидазы и полифенолоксидазы у растений, пораженных вирусами, слишком мало, чтобы делать определенные выводы. Исходя из этого, было необходимо проверить, коррелирует ли увеличение активности пероксидазы с изменением активности полифенолоксидазы при поражении растений вирусом L (вирусом скручивания листьев картофеля). Какова топография величин активности исследуемых ферментов в различных долях листьев зараженных растений?

Исследовали растения картофеля сорта Пауль Вагнер, выращенные в грунте и свободные от X-, Y-, S- и M-вирусов. Растения отбирали визуально и с помощью серологических тестов со специфическими сыворотками. Одну группу заражали вирусом L, вызывающим системное поражение, другая служила контролем. Для инфицирования растений на листья здоровых кустов подсаживали вирофорную тлю (*Myzodes persicae* Sulz.). Растения с хронической вирусной инфекцией выращивали из клубней, зараженных вирусом L (двухлетняя репродукция). Анализировали листья среднего яруса, от 4-го до 8-го, считая снизу. Опыты выполнены в фазе бутонизации.

Активность пероксидазы определяли по методу А. Н. Бояркина [1951], используя в качестве субстрата бензидин. Данные рассчитывали в относительных единицах на 1 мг белка либо на 1 г сырой ткани. Аналогичным методом определяли полифенолоксидазу [Бояркин, 1954], применяя субстрат — парафенилендиамин.

Опыты проведены с целью:

а) определить активность указанных ферментов в начале инфекционного процесса в выше- и нижележащих по отношению к зараженному листьям среднего яруса;

б) заразить самые верхние, интенсивно растущие листья растения-хозяина и определить активность пероксидазы и полифенолоксидазы в нижележащих листьях;

в) выяснить изменение активности изучаемых ферментов в средних листьях растений картофеля с хронической инфекцией вируса L. Для изучения индуцированной вирусом активности пероксидазы и полифенолоксидазы, как правило, заражают нижние листья, определяя активность ферментов в листьях вышележащих ярусов растений-хозяев. Мы определяли активность этих ферментов в инфицированном, а также в выше- и нижележащем листьях по отношению к зараженному [Омельченко, Андреева, 1981].

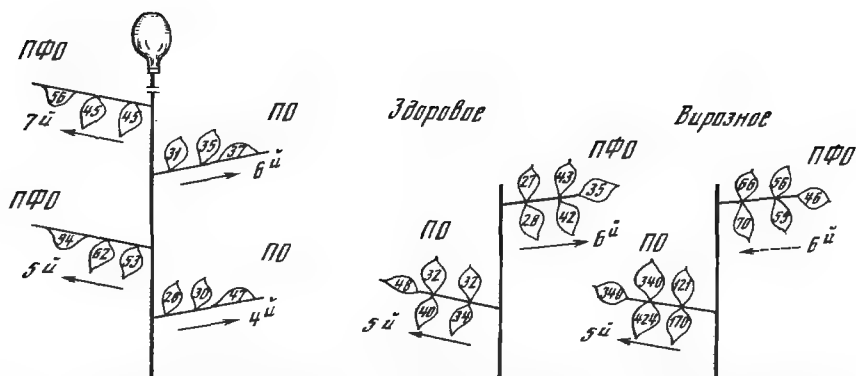
На рис. 2 показано, что в вирусном и контрольном растениях активность пероксидазы повышается в направлении от основания листа к его верхней доле (см. стрелки). У основания листьев она несколько ниже,

Согласно гипотезе Вестштейна [Weststeijn, 1976], в инфицированном участке в ответ на вирусное поражение очень быстро образуется «индуцирующий агент», который, распространяясь от клетки к клетке, обуславливает повышение активности фермента, участвующего в локализации вируса. В нашем опыте резкое повышение активности пероксидазы в нижележащем 6-м листе, очевидно, вызвано каким-то индуцирующим фактором, так как присутствие вирусных частиц в нем через 3 дня после инокуляции 7-го листа маловероятно.

Несколько иначе изменяется активность полифенолоксидазы в инокулированном листе. Для анализа были отобраны противоположные доли тех же листьев. Через 3 дня после инокуляции наибольшая по отношению к контролю активность обнаружена в доле у основания листа — 94 отн. ед., что в 2 раза выше, чем в верхней доле этого же листа (рис. 2, б). Таким образом, наименьшая активность полифенолоксидазы была в верхней доле листа, несколько выше — 70 отн. ед. — в средней и наивысшая — у основания листа. Как отмечено, для активности пероксидазы характерно противоположное направление повышения величин активности — от основания листа к его верхней доле. Активность пероксидазы в одной половине верхней доли инокулированного листа была наивысшей (241 отн. ед.), а полифенолоксидазы в противоположной половине того же листа — минимальной (47 отн. ед.). Эти данные очень наглядные и свидетельствуют об отсутствии прямой корреляционной связи между повышением активности пероксидазы и полифенолоксидазы в долях исследуемого листа.

Незначительное, на 14—20%, активирование полифенолоксидазы отмечено в вышележащем 8-м листе и на 10—28% в нижележащем 6-м по отношению к контролю. Такое изменение активности полифенолоксидазы не является определяющим, а полученные данные доказывают, что активность полифенолоксидазы достоверно повышается только в инокулированном листе (наиболее заметно — в доле у основания листа), и что нет коррелятивной связи между повышением активности пероксидазы и полифенолоксидазы.

Активность при заражении верхних молодых листьев. Возрастание активности пероксидазы в нижележащем листе через 3 дня после заражения свидетельствует о том, что вирус, или «индуцирующий агент», активизирует деятельность этого фермента как в выше-, так и в нижележащих листьях. Для подтверждения этого вывода в другом опыте инокулировали самые верхние листочки, а пробы брали через 14 дней после заражения. При этом определяли изменение активности исследуемых ферментов в нижележащих листьях среднего яруса (рис. 3). 14 дней было достаточно не только для размножения вируса, но и для распространения его по всему растению. Однако, несмотря на столь длительное время, вирус не оказал влияния на активность фермента пероксидазы в нижележащих листьях этого растения. Направление повышения величин активности было от основания листа к его верхней доле как для пероксидазы, так и для полифенолоксидазы. Разброс величин активности по долям листа не превышал ± 10 ед. для пероксидазы, что согласуется с контролем (см. рис. 2, а).



Р и с. 3 Активность пероксидазы и полифенолоксидазы в листьях растений картофеля сорта Пауль Вагнер через 14 дней после инфицирования верхних листьев вирусом L

Обозначения те же, что на рис. 2

Р и с. 4. Активность пероксидазы и полифенолоксидазы в разных долях листьев растений картофеля сорта Пауль Вагнер здоровых (контроль) и с хронической вирусной инфекцией

Обозначения те же, что на рис. 2

Следовательно, вирус L, находясь в условиях интенсивно делящихся клеток растущих листьев, максимально обеспечивающих его размножение пластическим материалом, в течение определенного времени не распространяется в нижележащие листья растений картофеля. Отсутствие индуцированного повышения активности пероксидазы в нижележащих листьях является косвенным доказательством локализации вируса в верхних листьях исследуемых растений.

Как указывает Мэтьюз [1973], при инокуляции вирусом табачной мозаики самых молодых листочков хорошо развитых растений табака или томатов листья нижних ярусов могут длительное время оставаться безвирусными. И, чем старше растение, тем сильнее выражена тенденция к локализации инфекции.

Для фермента полифенолоксидазы в нижележащих 5-м и 7-м листьях этого же растения было отмечено некоторое повышение активности, и это лишний раз подтверждает отсутствие строгой корреляции в изменении активностей этих ферментов. Таким образом, данные опыта свидетельствуют о том, что при заражении самых верхних листьев активность пероксидазы в нижележащих листьях среднего яруса не изменяется длительное время. Незначительное увеличение активности полифенолоксидазы имеет то же распределение, что и в контроле, и не совпадает с данными, представленными на рис. 2 и 4 для инокулированного листа.

Активность при хронической инфекции. Изучению особенностей метаболизма растений, выращенных из больных клубней, уделяется значительно меньше внимания, чем метаболизму первично инфицированных растений. В растениях картофеля с хронической инфекцией вирус L

уже присутствует в клубнях, а по мере роста и развития вегетативной массы занимает все новые клетки, активно репродуцируясь в них. Представляло интерес выяснить топографию величин активности исследуемых ферментов в долях листьев среднего яруса растений картофеля сорта Пауль Вагнер, выращенных из вирусных клубней. Сравнивая активность пероксидазы в разных долях 5-го снизу листа с контролем, было установлено, что она во всех долях вирусного листа в 4—10 раз выше (рис. 4). Так, в верхней доле 5-го здорового листа активность пероксидазы равна 48, в верхней доле больного — 340 отн. ед. Разброс величин активности в противоположных долях листьев контрольных растений минимальный и не превышает ± 5 ед. В опыте этот разброс активности в долях у основания листа зараженного растения составляет ± 25 , а в средних долях ± 40 ед. Активность пероксидазы в долях у основания вирусного листа была в 2—3 раза ниже, чем в средних и верхних долях. Для контрольных растений таких отклонений величин активности в разных долях одного и того же листа мы не наблюдали.

В отличие от пероксидазы активность полифенолоксидазы в долях вирусного листа этого же растения была выше лишь в 1,5—2 раза по отношению к контролю. Разброс величин активности в долях листа не превышал ± 2 ед., это говорит о том, что в вирусном растении изменения в метаболизме полифенолоксидазы выражены гораздо слабее, чем в метаболизме пероксидазы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что активность пероксидазы, индуцируемая вирусом L, возрастает значительно, чем активность полифенолоксидазы.

Высокая активность пероксидазы в разных долях исследуемых листьев дает основание предполагать, что вирус обуславливает напряжение метаболических процессов при хронической инфекции в течение всего вегетационного периода. Отсутствует прямая коррелятивная связь между повышением активности пероксидазы и активности полифенолоксидазы в разных долях вирусных листьев картофеля. Изменение метаболизма инфицированных растений связано прежде всего с окислительно-восстановительными процессами, в которых задействована пероксидаза.

5.4. ИЗОПЕРОКСИДАЗЫ РАСТЕНИЙ D. STRAMONIUM

Изучение изменений активности и спектра изоэнзимов пероксидазы при заражении вирусом L было продолжено на растениях дурмана, у которых лист морфологически более прост, чем у картофеля. Растения *Datura stramonium* реагируют на вирус скручивания листьев системным поражением — хлорозом листьев, проявляющимся на 21—25-й день после инокуляции. Исследования проводили в разные периоды инфекционного процесса: на 3, 7, 14, 21 и 40-й день после заражения вирусом [Андреева и др., 1973]. Белковые зоны с пероксидазной активностью были идентифицированы в полиакриламидном геле по их относительной электрофоретической подвижности (R_m) по методу Дэвиса [Davis, 1964] в модификации В. И. Сафонова и М. П. Сафоновой [1969]. Спектры изо-пероксидаз получены для листьев, средних жилок тех же листьев, стеблей и корней.

Таблица 6

Число изоэнзимов пероксидазы в растениях *D. stramonium*, здоровых и зараженных вирусом L

Орган	День после инокуляции									
	3-й		7-й		14-й		21-й		40-й	
	Здоровые	Больные	Здоровые	Больные	Здоровые	Больные	Здоровые	Больные	Здоровые	Больные
Листья	8	6	6	6	8	6	6	6	7	7
Жилки	5	6	5	6	5	6	7	7	6	6
Стебли	3	3	5	6	4	4	6	6	7	7
Корни	6	6	6	7	8	9	11	10	7	6

Сопоставление спектров изопероксидаз, проведенное с учетом динамики развития вирусной инфекции, показало, что под влиянием вируса L происходят существенные изменения, отражающиеся на подвижности изоэнзимов этого фермента. Количественный состав изопероксидаз вирусных и контрольных органов различался на один-два изоэнзима и составлял 6—8 зон для листьев, 5—7 для средних жилок листа. В стеблях и корнях были обнаружены несколько большие различия между сравниваемыми образцами, соответственно от 3 до 7 в стеблях и от 6 до 11 зон в корнях (табл. 6). Наибольшее количество изопероксидаз выявлено для контрольных корней — 11 зон с пероксидазной активностью. Следует также отметить, что только в корнях были идентифицированы малоподвижные изоэнзимы с R_m 0,06 и 0,1. В основном же относительная электрофоретическая подвижность определяемых белков была в пределах R_m 0,15—0,68.

В листьях наряду с изменением в подвижности изоэнзимов происходит, видимо, и ингибирование синтеза отдельных белков с пероксидазной активностью. Так, установлено, что сразу после заражения (3-й день) и в середине инфекционного процесса (14-й день) в листьях контрольных растений присутствовало по 8 изоэнзимов фермента пероксидазы, тогда как в вирусных листьях — лишь по 6 зон. На 3-й день после инокуляции изменения отмечены в спектре среднеподвижных белков, где есть зоны с электрофоретической подвижностью, равной 0,33; 0,38; 0,49 и 0,51, зарегистрированные в спектре фермента инфицированных листьев. Следовательно, у среднеподвижных изопероксидаз идет какая-то перестройка, сопровождающаяся изменениями как состава, так и подвижности исследуемых белков [Андреева и др., 1973]. Анализируя спектры белков жилок, нужно отметить, что если в листьях больных растений происходит исчезновение двух белков на 3-й и 14-й день после инокуляции, то в жилках тех же листьев вирус индуцирует образование одной дополнительной белковой зоны (см. табл. 6).

Если сопоставить данные спектра белков по растению в целом, то изменения состава изопероксидаз отмечены также для стеблей и корней. Во всех органах исследуемых растений изопероксидазы представлены главным образом среднеподвижными и быстро движущимися изо-

энзимами, и только в корнях идентифицированы малоподвижные компоненты изопероксидаз. Спектр белков пораженных корней на 7-й день после заражения состоял из 7 изоэнзимов пероксидазы, а в контроле — из 6 зон; на 14-й день в опыте — из 9, в контроле — из 8. При проявлении симптомов заболевания (21-й день) и к концу вегетационного процесса (40-й день) число изоферментов в вирозных корнях было ниже, чем в здоровых.

Под влиянием вируса происходит как ингибирование синтеза некоторых изоэнзимов пероксидазы, так и индуцированный синтез изопероксидаз *de novo* (см. ранее, 3.7).

Определение изоферментного спектра полифенолоксидазы показало, что в исследуемых органах *D. stramonium* обнаружено от 5 до 8 зон с полифенолоксидазной активностью. Здесь, так же как и в опытах с пероксидазой, появление дополнительных зон отмечено для жилок вирозных листьев [Андреева, Омельченко, 1976].

Перестройка в спектре изопероксидаз, обнаруженная в разных органах растений *D. stramonium*, зараженных вирусом L, вызывает ряд вопросов, и первый из них: зачем синтезируются новые изоферментные белки, когда изоэнзимы с аналогичной специфичностью присутствуют в клетке до заражения? Возможно, что вновь образованные изоэнзимы в меньшей степени подвергаются контролю со стороны клеточных регулирующих механизмов или имеют повышенное сродство к определенному субстрату. Новацкий и Хемптон [Novacky, Hampton, 1968] пришли к выводу, что появление новых изоэнзимов связано со старением, так как при вирусной инфекции процесс старения в пораженных растениях идет гораздо быстрее. Чант и Бейтс [Chant, Bates, 1970] в листьях зараженных растений обнаружили дополнительный белок с пероксидазной активностью и также предполагают, что проявление этого изоэнзима может быть связано с преждевременным старением растения.

Однако с утверждением указанных авторов нельзя согласиться, поскольку в инфицированных растениях отмечено как появление новых изоэнзимов пероксидазы, так и исчезновение зон, обнаруженных ранее в здоровых органах исследуемых растений. Если бы появление новых пероксидаз было связано только со старением, то при анализе разных органов одного и того же растения обнаруживались бы какие-то закономерные явления, но они не наблюдались. Наши данные свидетельствуют о том, что к концу вегетации (21-й и 40-й дни) белки с R_m , равными 0,60—0,61 и 0,67—0,68 соответственно, присутствуют только в спектре здоровых листьев, тогда как в зараженных органах эти зоны отсутствуют. Число изопероксидаз в листьях здоровых и вирозных растений (40-й день) было одинаково, а подвижность некоторых из них различна.

Возможен и другой путь повышения активности пероксидазы — переход в более активное состояние уже имеющихся изоформ фермента или изменение внутриклеточной локализации их. Однако экспериментальные данные, полученные с применением ингибиторов белкового синтеза [Farkas, Stahmann, 1966; и Shannon et al., 1971], показали, что изменение активности пероксидазы происходит в основном по первому пути и новые изоэнзимы появляются в результате биосинтеза, а не активации фермента.

На основании данных, полученных нами, можно сделать вывод, что вирус скручивания листьев, существенно изменяя метаболизм растения-хозяина, индуцирует и ингибирует синтез белков, обладающих пероксидазной активностью. Вопрос о том, вызывает ли заболевание специфическое изменение активности и спектра изоэнзимов, присутствующих в здоровых растениях, или подобное явление наблюдается и при старении, пока не выяснен. Изучение особенностей изоферментных спектров различных органов, обладающих разными физиологическими и биохимическими функциями, контроль за изменением спектра в присутствии вирусной инфекции, а также выделение и характеристика индивидуальных белков с соответствующей активностью могут быть одним из путей к выяснению биологической роли гетерогенности ферментных систем и их адаптивных особенностей.

5.5. ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ ШТАММОВ ХВК НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА

Известно, что разные штаммы одного и того же вируса различаются по физико-химическим свойствам и влиянию на растение-хозяин [Novikov, Atabekov, 1970; Мэтьюз, 1973; Nishiguchi et al., 1980]. Характер изменения активности пероксидазы при поражении растений разными по патогенности штаммами одного вируса исследован слабо. Мы сравнили уровень активности пероксидазы в листьях разных ярусов растений *D. stramonium* в первые дни развития инфекционного процесса с накоплением вирионов в тех же листьях исследуемых растений [Андреева и др., 1977]. Для заражения были взяты два штамма Х-вируса картофеля (ХВК): таежный — X_{τ} -сильнопатогенный, идентифицированный и выделенный из растений сорта Харли и X_{γ} -слабопатогенный, выделенный из растений картофеля сорта Кобблер [Рейфман, Колесникова, 1973]. Первый вызывает на листьях *Gomphrena globosa* некротизацию, сильную мозаику и сравнительно быстрое отмирание ткани, второй не дает внешних симптомов заболевания.

Два нижних листа заражали инокулюмом, содержащим 300 мкг/мл вируса. Через определенные интервалы времени (3, 5, 7, 10 и 15 дней) в листьях определяли титр вируса по количеству некротов на половинках листьев растения-индикатора. Активность фермента измеряли в листьях нижнего, среднего и верхнего ярусов исследуемых растений. Было установлено, что в листьях всех ярусов растений *D. stramonium*, зараженных

Т а б л и ц а 7

Активность пероксидазы (отн. ед. на 1 г сырой ткани) в листьях *D. stramonium* на 15-й день после инокуляции

Ярус листьев	Здоровые	Зараженные X_{γ} -штаммом	Зараженные X_{τ} -штаммом
Верхний	14,7	22,4	95,0
Средний	12,7	26,1	76,0

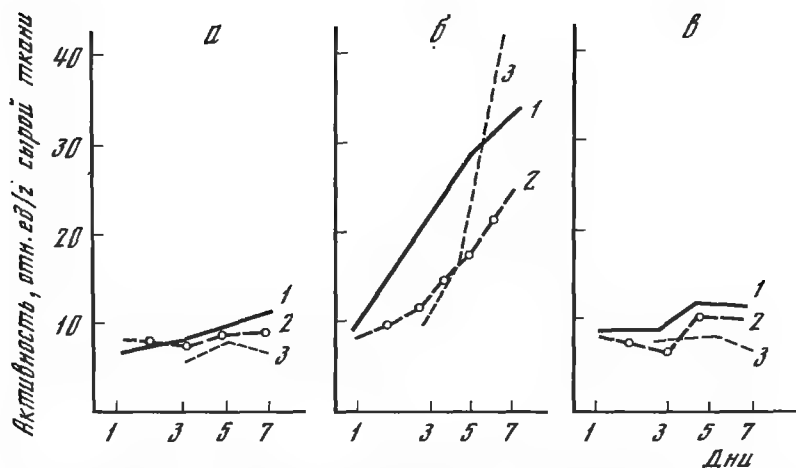


Рис. 5. Активность пероксидазы в листьях дурмана разных ярусов
 а — контроль; б — зараженные X_t -штаммом; в — зараженные X_y -штаммом; ярусы листьев: 1 — нижний, 2 — средний, 3 — верхний

сильнопатогенным штаммом X_t ВК, активность фермента пероксидазы значительно повышена по сравнению с контролем (рис. 5). Особенно заметно это увеличение выражено в молодых листьях (рис. 5, б, 3), где через 5—7 дней обнаруживается достаточно высокое количество вирусных частиц. В дальнейшем активность остается высокой независимо от суровости проявления заболевания и снижения количества вирионов, вплоть до отмирания ткани. Так, на 15-й день после заражения X_t -штаммом активность пероксидазы в листьях верхнего яруса в 6,5 раза выше контроля, хотя количество вирионов в них к этому времени резко снизилось.

Совершенно другая картина наблюдается в растениях, инфицированных слабопатогенным штаммом. Активность пероксидазы в листьях всех ярусов этих растений по отношению к контролю изменяется незначительно (рис. 5, в), и это в то время, когда количество вирусных частиц X_y -штамма в листьях всех ярусов много выше, чем X_t . Из этого следует, что не концентрацией вирусных частиц определяется повышение активности пероксидазы, а его патогенностью (табл. 7). В среднем ярусе листьев вирусные частицы X_t -штамма обнаруживаются только на 10-й день, но активность фермента уже на 3-й день после заражения выше (рис. 5, б, 2), чем в здоровых листьях (рис. 5, а, 2). В дальнейшем активность пероксидазы заметно возрастает и на 15-й день в 6 раз превышает контроль (табл. 7), несмотря на то что количество вирусных частиц в листьях невелико. Нижние, инокулированные листья к этому времени уже опадают.

Следовательно, за один и тот же период времени в листьях растений *D. stramonium* накапливается разное количество вирусных частиц для слабо- и сильнопатогенного штаммов X -вируса картофеля и нет прямой коррелятивной зависимости между количеством вирусных частиц и па-

тогенностью штаммов. Было также показано, что при заражении X_u - и X_v -штаммами вируса картофеля растений табака сорта Ксанти не различия в активности фермента пероксидазы между здоровыми и инфицированными растениями весьма значительная [Андреева и др., 1979]. С учетом различия в повышении активности и изменения спектра пероксидазы зараженных растений были изучены физико-химические и кинетические свойства пероксидазы, выделенной из вирозных и контрольных растений.

5.6. ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРОКСИДАЗ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ *D. STRAMONIUM*

Впервые для вирозных растений был выделен суммарный препарат фермента из растений дурмана, зараженных сильнопатогенным штаммом X_v ВК [Андреева, Омельченко, 1978]. Результаты очистки пероксидазы приведены в табл. 8. Из полученных данных видно, что отношение специфической активности фермента из зараженных листьев к активности фермента из контрольных листьев осталось постоянным. Это говорит о том, что в процессе очистки активность не была потеряна и полученный препарат пероксидазы можно считать нативной формой энзима.

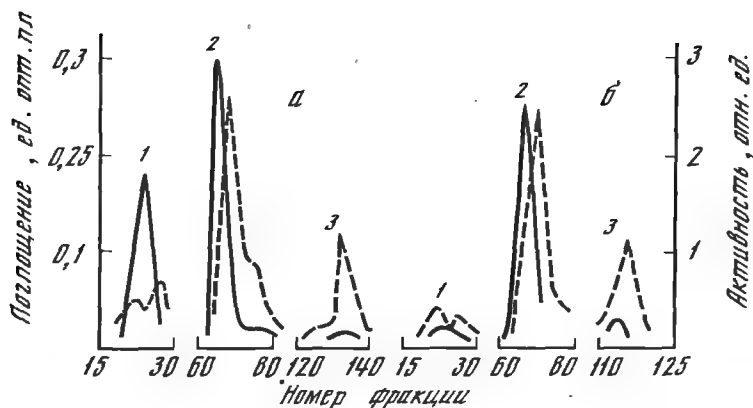
После разделения на сефадексах G-25, G-100 и хроматографирования методом ступенчатого градиента на ДЭАЭ-целлюлозе препарат фермента разделили на три группы, различающиеся как по изоэнзимному спектру, так и по активности. Общая активность препарата очищенной пероксидазы из контрольных растений была практически в 2 раза ниже активности препарата фермента, выделенного из инфицированных листьев. Неизменным оставался коэффициент отношения исходной активности к очищенной, как в опыте, так и в контроле он был равен 1,8. Этот показатель свидетельствует о том, что выделен препарат фермента, сохраняющий свою каталитическую нативность (табл. 8). Профиль элюции с ДЭАЭ-целлюлозы и электрофореграммы изоэнзимов фермента представлены на рис. 6 и 7.

Данные рис. 6, а свидетельствуют о том, что активность пероксидазы листьев инфицированных растений, вышедшая в первом пике (1), в 5 раз

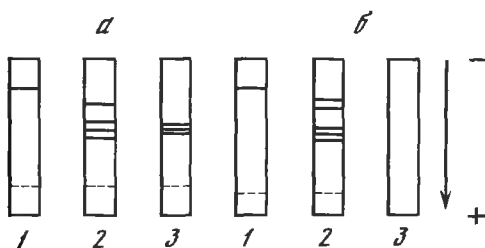
Т а б л и ц а 8

Результаты очистки пероксидазы из растений *D. stramonium*

Этап	Здоровые		Инфицированные X_v ВК		Отношение (2):(1)
	Активность (1), ед/мг белка	Степень очистки	Активность (2), ед/мг белка	Степень очистки	
Начальный, центрифугирование, 30 000 g	450	1	800	1	1,8
Конечный, хроматография после ДЭАЭ-целлюлозы	25 730	57,1	48 290	60,4	1,8



Р и с. 6. Профиль элюции пероксидазы листьев дурмана с ДЭАЭ-целлюлозы
а — инфицированные; б — контрольные; 1 — трис-НСl буфер, рН 7,4; 2 — бу-
фер + 0,2 М NaCl; 3 — буфер + 0,4 М NaCl; сплошная линия — активность, пунктир —
белок



Р и с. 7. Электрофореграммы фракций пероксидазы листьев дурмана, элюируемых
с ДЭАЭ-целлюлозы
а — инфицированные; б — контрольные; 1 — трис-НСl буфер; 2 — буфер + 0,2 М
NaCl; 3 — буфер + 0,4 М NaCl

выше по отношению к контрольной (рис. 6, б, 1). При этом общее содержание белка во фракции этого пика было ниже, чем во фракции из здоровых листьев. Белок определяли по Лоури [Lowry et al., 1951]. Дальнейшее элюирование изопероксидаз при добавлении в буфер 0,2 М NaCl позволило (рис. 6, 2) выделить и идентифицировать на электрофореграммах второго пика пять четко выраженных зон изоэнзимов фермента для контрольных растений, но лишь четыре для инфицированных (рис. 7, 2). Активность же последних при одинаковом количестве элюируемого белка, как и в первом пике, была выше, чем во фракции здоровых растений. Следовательно, не количество белка определяет активность изоэнзимов пероксидазы зараженных листьев, а их каталитическое состояние. Связано это изменение активности с деятельностью индивидуальных изопероксидаз, которые активизируются при инфицировании растений сильнопатогенным штаммом X₇ВК.

Белки третьего пика, элюируемые буфером с добавлением 0,4 М NaCl, также существенно различались. Так, в контроле изоэнзимы перок-

сидазы электрофоретически не обнаружены, тогда как фракция из листьев зараженных растений дала три четкие полосы с пероксидазной активностью. В суммарном белке из неинфицированных листьев эти изоэнзимы присутствуют в минимальном количестве и улавливаются лишь весьма чувствительной качественной реакцией, а в аналогичной фракции из листьев зараженных растений содержание их значительно выше и обнаруживаются они очень четко как по качественной реакции, так и электрофоретически (рис. 7, 3).

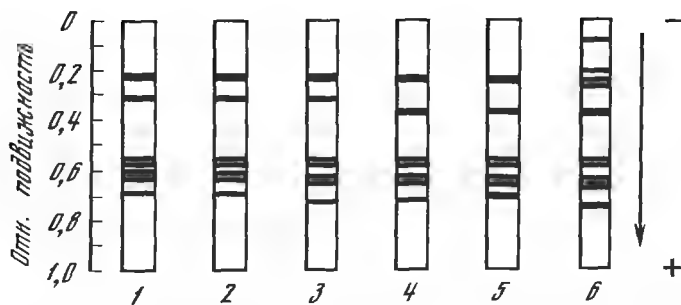
Остается открытым вопрос: специфичны ли наблюдаемые нами различия для вирусного поражения? Можно предполагать, что специфичны, так как для механического поражения и грибного поражения обнаружены свои различия в наборе и свойствах изоэнзимов ферментных белков [Кожанова, Аксенова, 1976; Lobarzewski, 1981].

Ниже мы более подробно остановимся на физико-химической характеристике изопероксидаз, выделенных из растений *D. stramonium*. С очищенным суммарным препаратом фермента контрольных и зараженных X_7V растений было получено как с искусственными (пирогаллол, гваякол, парафенилендинамин), так и с естественными (хлорогеновой и кофейной кислотами) субстратами по пять четко окрашенных зон (рис. 8, 1—5). И только с бензидином, наиболее чувствительным донором водорода, на электрофореграммах проявилось по семь изоэнзимов фермента (рис. 8, 6). С этим субстратом для сравниваемых пероксидаз обнаружено дополнительно еще два медленно движущихся изоэнзима с R_m 0,08 и 0,2.

Однако методом изоэлектрофокусирования на ПАГ-пластинках, содержащих амфолины в диапазоне pH 3,5—9,5, определено 14 белков с пероксидазной активностью (рис. 9). Из них три катионных с изоэлектрическими точками — 9,4; 8,7 и 8,0; пять изоэнзимов нейтральных и слабокислых — 7,0; 6,7; 6,5; 6,3 и 5,9; остальные — кислые анионные белки с изоэлектрическими точками — 5,3; 5,0; 4,5; 4,2; 4,0 и 3,8. Итак, в составе изопероксидаз растений дурмана преобладают в основном кислые изоэнзимы фермента. Три быстро движущихся изоэнзима содержатся в наибольшей концентрации. Именно для этих пероксидаз из зараженных X_7VK растений интенсивность окраски и скорость проявления с различными субстратами идут всегда быстрее, чем в контроле [Андреева, Омельченко, 1985].

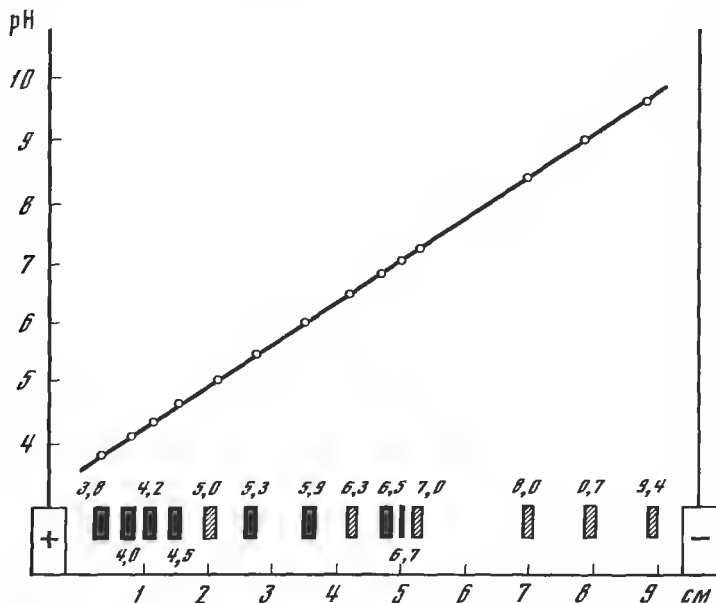
Различия в количестве изопероксидаз, полученные методом электрофореза (рис. 8) и при изоэлектрофокусировании (рис. 9), очевидно, происходят от того, что при электрофорезе некоторые изоэнзимы движутся в электрическом поле вместе и занимают одинаковое положение. Факты эти в литературе описаны. При изоэлектрофокусировании амфолины, входящие в состав геля, способствуют более четкому разделению белковых препаратов, удерживая белки в их изоэлектрических точках.

Для шести изопероксидаз растений дурмана была определена молекулярная масса, рассчитанная по относительной электрофоретической подвижности изоэнзимов пероксидазы для семи различных концентраций геля, и построен график зависимости концентрации геля — $100 \cdot (\log R_m \cdot 100)$ [Hedrick, Smith, 1968; Бузун, 1976]. Так, для пероксидазы из листьев дурмана этим методом выявлено шесть изоэнзимов, причем при



Р и с. 8. Схема зимограмм суммарной пероксидазы листьев дурмана с различными субстратами

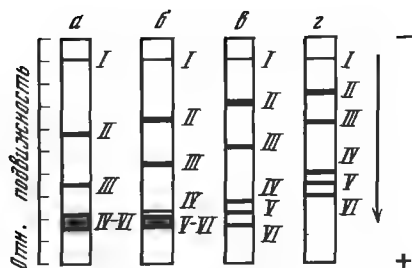
1 — гваякол; 2 — парафенилендиамина; 3 — кофейная кислота; 4 — хлорогеновая кислота; 5 — пирогаллол; 6 — бензидин



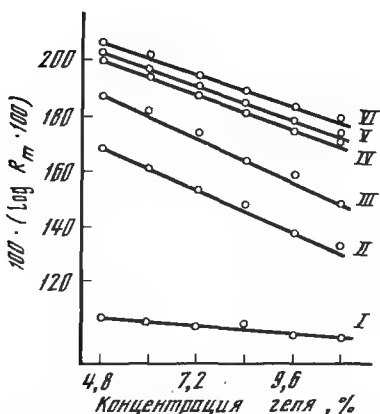
Р и с. 9. Изоэлектрические точки изоэнзимов суммарной пероксидазы в диапазоне pH 3,5—9,5

разделении белков в гелях низкой концентрации получено меньшее число изопероксидаз, чем в гелях с высокой концентрацией акриламида. При 4,8%-ной концентрации акриламида определено всего четыре зоны с искомой активностью. Из них три изоэнзима отдельно, а три других передвигались в виде широкой зоны вслед за линией фронта (рис. 10, а). В 6%-ном геле выявлено пять изоэнзимов: четыре отдельных и два совмещенных. Начиная с 7,2%-ной и выше концентрации геля идентифицировано по шесть зон с пероксидазной активностью (рис. 10, в, г).

На рис. 11 приведены линии регрессии изоэнзимов пероксидазы.



Р и с. 10. Электрофоретический спектр пероксидазы растений дурмана в гелях разной концентрации акриламида
а — 4,8%; б — 7,2; в — 8,4; г — 10,0%



Р и с. 11. Линии регрессий I—VI для изоэнзимов пероксидазы растений дурмана

R_m медленно движущейся I зоны белка не изменялась в гелях разной концентрации, что говорит об очень низкой молекулярной массе. II и III зоны белков имеют молекулярную массу 49 и 58 кДа соответственно. Линии регрессий IV, V, VI изоэнзимов параллельны, что свидетельствует о близкой или одинаковой молекулярной массе этих белков, но о разной величине зарядов. Тангенс угла наклона линий регрессии небольшой, значит, масса этих белков очень низкая (рис. 11). Предположительно она лежит в пределах 10—14 кДа. Из шести изопероксидаз, определяемых электрофоретически, три быстро движущиеся имеют одинаковую молекулярную массу, но различаются по заряду и, видимо, являются белками-конформерами.

Таким образом, на основании проведенных исследований было показано, что изоэнзимы пероксидазы растений *D. stramonium* имеют молекулярную массу от 10 до 58 кДа. Методом изоэлектрофокусирования выявлено 14 зон с пероксидазной активностью, следовательно, в составе изопероксидаз, выявленных электрофорезом, присутствует более чем шесть белков. Остальные белки имеют сходный заряд и подвижность в гелях разной концентрации, и их масса укладывается в пределы, идентифицированные методом электрофореза. Различия в молекулярной массе изоэнзимов изучаемого фермента подтверждают его физико-химическую гетерогенность. Выявленные 14 изоэнзимов с различными изоэлектрическими точками, лежащими в пределах pH 3,8—9,4, свидетельствуют о том, что в состав фермента растений *D. stramonium* входят пероксидазы с различным pH-оптимумом биохимического действия на субстраты.

Таким образом, как показано в этой главе, активность фермента пероксидазы значительно повышается при действии вирусов разной природы (Л, ХВК). Суровость патогена определяет более высокое значение активности. Отсутствует коррелятивная связь между повышением ак-

тивности пероксидазы и полифенолоксидазы. Оказывая влияние на метаболизм растения-хозяина, вирус как индуцирует, так и ингибирует синтез изоэнзимов изучаемого фермента, о чем свидетельствуют электрофорграммы. Условия очистки фермента не изменяли соотношение активности пероксидазы опыт/контроль. Следовательно, есть возможность вести сравнительное изучение пероксидаз, выделенных из вирозных и контрольных растений, что весьма важно для сопоставления физико-химических характеристик фермента, необходимых для понимания каталитического действия пероксидазы в инфицированном растении.

ГЛАВА 6

ПЕРОКСИДАЗЫ РАСТЕНИЙ ТАБАКА

6.1. АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА ПРИ СИСТЕМНОМ ПОРАЖЕНИИ

Известно, что активность пероксидазы повышается как у растений-хозяев, реагирующих на заражение образованием некрозов, так и у растений с системным проявлением заболевания. Растения табака сорта Самсун (системный хозяин) реагируют на ВТМ (обыкновенный штамм) ярко выраженной мозаикой, состоящей из темно- и светло-зеленых зон. Для растений этого сорта была измерена активность фермента в разных зонах мозаичных листьев верхнего яруса на 15, 20, 35 и 40-й день после заражения нижних листьев. Установлено, что как в темно-зеленых, так и в светло-зеленых зонах активность пероксидазы выше, чем в контроле (табл. 9). Однако наиболее высокой активностью была в темно-зеленых участках листовой ткани. Так, на 20-й день в темно-зеленых участках активность была в 7 раз выше, чем в контроле, а в светлых зонах выше лишь в 3 раза. Такое повышение активности пероксидазы в листьях верхнего яруса сохранялось на 35—40-й день после заражения, и в темных участках она была наиболее высокой.

Проверена также активность фермента в апикальной и базальной частях листьев среднего яруса, где симптомы заболевания выражены менее резко, чем в верхних листьях. Оказалось, что активность пероксидазы в этих листьях была несколько ниже, чем в верхних, причем в ба-

Т а б л и ц а 9

Активность пероксидазы (отн. ед./г ткани) в листьях здоровых и зараженных ВТМ растений табака сорта Самсун (сист.)

Время взятия проб после заражения	Верхние листья, 12 см		
	Темно-зеленые зоны	Светло-зеленые зоны	Здоровые
15-й день	4,34	3,17	1,30
20-й день	9,65	5,05	1,32

Таблица 10

Активность пероксидазы (оти. ед./г ткани) в разных участках листьев здоровых и зараженных ВТМ растений табака сорта Самсун (сист.)

Время взятия проб после заражения	Апикальная зона	Здоровые	Базальная зона	Здоровые
15-й день	3,70	2,00	6,12	1,68
20-й день	4,82	2,47	6,24	1,80

зальной части листьев она была выше, чем в более старой — апикальной (табл. 10).

У растений табака сорта Самсун (сист.) были заражены самые верхние молодые листья и через 10 дней проверена активность фермента в зараженных и нижележащих листьях. Верхние, зараженные листья к этому времени имели слабо выраженную мозаику. Появилась мозаика и на трех нижележащих листьях. Однако на самых нижних листьях симптомы заболевания к этому сроку еще отсутствовали. Активность пероксидазы, выраженная в отн. ед./г ткани, через 10 дней после заражения распределялась следующим образом:

	Верхние	Нижние
Здоровые (контроль)	1,30	2,73
Зараженные ВТМ	4,53	5,48

Следовательно, при наличии симптомов заболевания активность фермента выше контроля в 3,5 раза, а при отсутствии симптомов в нижних листьях также выше контроля, но только в 2 раза.

Данные, полученные нами по распределению активности фермента пероксидазы в разных зонах листа и в различных листьях, особенно интересны в связи с тем, что в темных и светлых зонах содержится разное количество вирусных частиц. Для растений табака сорта Самсун было установлено, что в темно-зеленых зонах присутствует лишь 20% вирусных частиц ВТМ по отношению к контрольным листьям [Kluge, 1976, 1983]. Из темно-зеленых островков после регенерации можно получить до 50% растений, свободных от вирусных частиц [Murakishi, Carlson, 1976]. Авторы считают, что в листьях таких безвирусных растений присутствует какой-то фактор, подавляющий размножение ВТМ. Установлено также, что содержание общего и растворимого белка на 28—68% выше в темно-зеленых участках по сравнению со светлыми [Kluge, 1983]. Авторы полагают, что обнаруженные различия связаны с активным проявлением устойчивости к ВТМ в темно-зеленых зонах.

В темных участках выше содержание пероксидазы и меньше вирусных частиц, а в светлых участках и в нижних листьях наоборот. Следовательно, есть обратная коррелятивная зависимость между активностью пероксидазы и репродукцией ВТМ. Высокий уровень активности фермента, очевидно, тесно связан с проявлением устойчивости к ВТМ в темных участках исследуемых листьев.

6.2. АКТИВНОСТЬ ПРИ ЛОКАЛЬНОМ ПОРАЖЕНИИ

Для выяснения взаимосвязи между количеством вирусных частиц в инокулюме, числом некрозов, появляющихся в ответ на заражение устойчивых растений, и проявлением активности пероксидазы при этом был поставлен следующий эксперимент. Листья среднего яруса растений табака сорта Ксанти нк заражали вирусом табачной мозаики, применяя инокулюм с различной концентрацией вирусных частиц — 10, 100 и 200 мкг/мл. После появления некрозов листья отбирали в пробы для подсчета количества некротических пятен и определения активности фермента в них. На основании подсчета установлено, что увеличение числа некрозов прямо коррелирует с повышением содержания вирусных частиц в инокулюме. Активность фермента не зависела от концентрации вируса в суспензии и от количества некрозов на инокулированных листьях и была в 2,5—3 раза выше, чем в контроле (табл. 11).

При инокуляции вирусом в концентрации 10 мкг/мл на листьях обнаружено в среднем по 28 некрозов и активность равнялась 5,15 отн. ед./г сырой ткани. При нанесении вируса в концентрации, в 20 раз превышающей указанную, количество некрозов на листьях было почти в 8 раз больше, тогда как активность фермента практически оставалась на том же уровне. Эти данные свидетельствуют об отсутствии связи между активностью пероксидазы и числом некрозов на инокулированных листьях. В противном случае увеличение числа некротических образований с 28 до 220 привело бы к более высокому уровню активности исследуемого фермента. Таким образом, установлено, что повышение активности пероксидазы не определяется числом некрозов, появляющихся на инокулированных листьях исследуемых растений.

Ранее нами было показано, что количество вирусных частиц, присутствующих в листьях зараженных растений, также не коррелирует с величиной активности этого фермента (см. 5.5) и активность зависит лишь от патогенности штамма X-вируса картофеля. Следовательно, ни количество некрозов на листе, ни количество вирусных частиц в зараженном листе не имеет прямой связи с активированием фермента пероксидазы. Для проверки этого вывода было определено изменение активности фермента пероксидазы в листьях разных ярусов и возраста после заражения нижних листьев растений табака сорта Ксанти нк.

Установлено, что через 5—6 дней после заражения ВТМ в самых молодых, только отрастающих листьях активность пероксидазы повы-

Т а б л и ц а 11

Влияние ВТМ на активность пероксидазы листьев табака сорта Ксанти нк

Растения	Концентрация вируса, мкг/мл	Число некрозов на лист	Активность, отн. ед./г сырой ткани
Здоровые (контроль)	0	0	1,83
Зараженные ВТМ	10	28	5,15
	100	97	4,90
	200	220	5,53

Таблица 12

Активность пероксидазы (отн. ед./г сырой ткани) в листьях разного яруса растений табака сорта Ксанти нк

Растения	Верхний, 7—9 см	Верхний, 12—16 см	Средний
Инфицированные ВТМ	19,53	21,04	31,57
Здоровые (контроль)	8,67	6,93	18,37
Инфицированные/здоровые	2,25	3,05	1,7

шается незначительно. В молодых листьях, имеющих длину листовой пластинки 7—9 см, активность фермента увеличивается в 2 и более раза по сравнению с контролем (табл. 12). В листьях зараженных растений, имеющих длину 12—16 см, активность пероксидазы была в 3 раза выше контроля. Следует отметить, что в отрастающих листьях такого же размера активность фермента также остается высокой и после того, как нижние некротизированные листья опадут. Этот феномен лишний раз подчеркивает, что активирование пероксидазы в этих листьях связано с защитной функцией растения-хозяина и зависит от фактора (возможно, ее субстрата), индуцирующего каталитическую деятельность фермента на сравнительно длительный промежуток времени.

В листьях среднего яруса, закончивших рост, активность фермента могла быть в 1,5—3 раза выше контрольной. Полученные данные представляли интерес для выбора яруса листьев, из которых выделяли фермент, необходимый для дальнейшего изучения каталитических и физико-химических свойств пероксидазы в связи с вирусным поражением.

6.3. ХАРАКТЕРИСТИКА СУММАРНЫХ ПЕРОКСИДАЗ РАСТЕНИЙ ТАБАКА

Для более детальной характеристики фермента были проведены выделение, частичная очистка и сравнительное изучение физико-химических свойств пероксидазы из листьев табака сортов Ксанти и Самсун, зараженных разными вирусами (ВТМ, X_t , X_y). Заражение растений, взятие проб и выделение фермента проводили, как описано ранее [Андреева и др., 1979]. Растения сорта Ксанти на заражение X_t и X_y -штаммами вируса картофеля отвечают системным поражением. При этом суровый X_t -штамм в процессе развития инфекции вызывает образование светлых колец, а слабопатогенный X_y -штамм не дает симптомов заболевания совсем. Однако и в том и другом случае активность пероксидазы после заражения возрастала и составляла 180% для растений, пораженных слабопатогенным штаммом, и 240% для пораженных сильнопатогенным штаммом по отношению к контролю (табл. 13).

Согласно данным табл. 13, препарат фермента очищен в 250 раз. Хроматографический профиль элюции пероксидазы после разделения на сефадексе G-100 идентичен для здоровых и инфицированных растений (рис. 12). Фракции с наибольшей пероксидазной активностью (отмечены штрихом) использовали для последующей работы. Методом диск-электрофореза в спектре пероксидаз, выделенных из здоровых и вирусных

Таблица 13

Результаты очистки пероксидазы, выделенной из листьев табака сорта Ксанти нк

Листья	Активность, отн. ед./мг белка		Степень очистки	% к контролю	
	Исходный экстракт после центрифугирования	После очистки		Исходный экстракт после центрифугирования	После очистки
Здоровые (контроль)	0,16	47,37	254	—	—
Зараженные X _y -штаммом	0,30	74,10	244	186,5	180
Зараженные X _y -штаммом	0,38	95,45	259	235,5	240

растений табака сорта Ксанти, было идентифицировано по 10 изоэнзимов. Активность отдельных изопероксидаз в препаратах из зараженных растений была значительно интенсивнее, чем в контроле, при одинаковом количестве наносимого на гель белка (рис. 13).

Молекулярная масса исследуемых пероксидаз была определена методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-100, откалиброванной по стандартным белкам. Выход белков с колонки контролировался автоматически по оптической плотности на Uvicord II марки 8300 с самописцем фирмы ЛКБ (Швеция). Суммарная молекулярная масса сравниваемых пероксидаз оказалась равной 40 кДа. Различий по молекулярной массе между изопероксидазами здоровых и вирусных растений мы не обнаружили. Пероксидазы растений табака сорта Барлей были выделены и разделены на три группы с молекулярными массами 27, 43 и 47 кДа [Nessel, Mäder, 1977]. Определение молекулярной массы изоэнзимов А, С₃ и С₄, выделенных из культуры ткани табака разновидностей W-38 и WR-132, показало, что она может быть равной 46, 67 и 90 кДа [Powell et al., 1975]. Эти данные свидетельствуют о том, что молекулярная масса индивидуальных изоэнзимов пероксидазы растений табака существенно различается, а в основе этих различий лежат их физико-химические свойства.

Активность при различных значениях pH. Для исследуемых пероксидаз проверена стабильность фермента при различных значениях pH. Для этого аликвоты фермента помещали в разные условия среды инкубации и через определенные промежутки времени измеряли пероксидазную активность (табл. 14). В опыте были использованы те значения pH, которые соответствовали буферным растворам, обычно применяемым в процессе выделения и очистки фермента. Данные табл. 14 показывают, что в кислой среде (pH 4, 6) активность фермента более высокая, но фермент менее стабилен. Так, спустя 8 сут от начала опыта при инкубации в этих условиях активность пероксидазы снизилась почти вдвое.

При более высоких значениях pH активность падает незначительно.

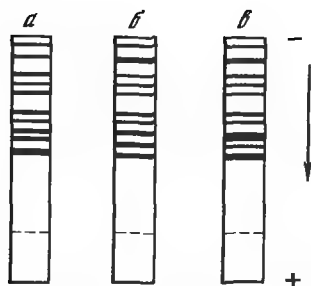
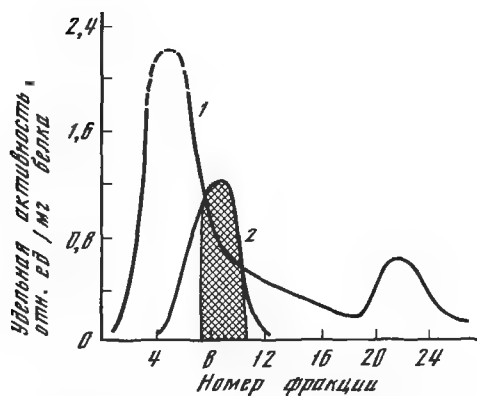


Рис. 12. Гель-фильтрация пероксидазы растений табака сорта Ксанти нк на сефадексе G-100 (1,5×30 см)

1 — белок; 2 — активность

Рис. 13. Изоферментный спектр пероксидазы здоровых (а) и зараженных штаммами X_y (б) и X_r (в) растений табака сорта Ксанти нк

Через 8 сут от начала опыта активность фермента при pH 7,4 и 8,5 упала лишь на 11—12%. Следовательно, слабощелочная среда является наиболее стабилизирующей для исследуемых пероксидаз. Однако через час после начала опыта исходная активность фермента при щелочных значениях pH была значительно ниже, чем измеренная в кислой среде. Согласно данным табл. 14, активность пероксидазы табака при pH 8,5 составляла 2,6 единицы и была в 5 раз ниже активности фермента при pH 4,6.

Для пероксидазы здоровых и зараженных растений табака зависимости активности от pH среды совпадают (рис. 14). Как видно на рисунке, фермент, выделенный из здоровых и зараженных вирусами растений, окисляет о-дианизидин с максимальной скоростью при pH 5,0, что согласуется с данными Мэдера и др. [Mäder et al., 1977]. Не обнаружено влияние вирусной инфекции на pH-оптимум проявления активности пероксидазы, выделенной из растений разных сортов табака: Ксанти нк и Самсун (сист.) [Андреева и др., 1979].

Определение термостабильности фермента. Термическую стабильность пероксидазы определяли по скорости инактивации ее в растворе при

Таблица 14

Изменение активности (в ед. опт. пл./с·10⁻³) пероксидазы растений табака в зависимости от pH и продолжительности опыта

pH	0 ч	1 ч	14 ч	38 ч	7 сут	8 сут	Остаточная активность, %
4,6	12,6	11,3	8,1	8,2	7,6	7,0	55,5
7,4	7,4	7,3	6,0	5,7	6,3	6,6	89,2
8,5	2,6	2,6	2,3	2,2	2,3	2,3	88,4

Рис. 14. Окисление о-дианизидина пероксидазой, выделенной из здоровых (1) и зараженных (2) тканей табака сорта Ксанти нк при различных значениях pH

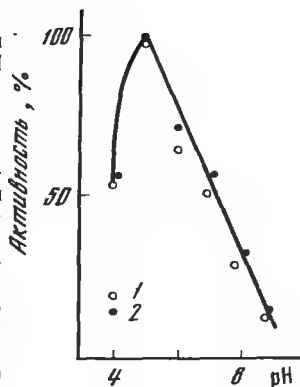
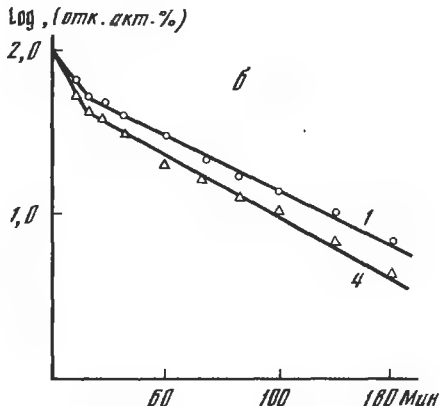
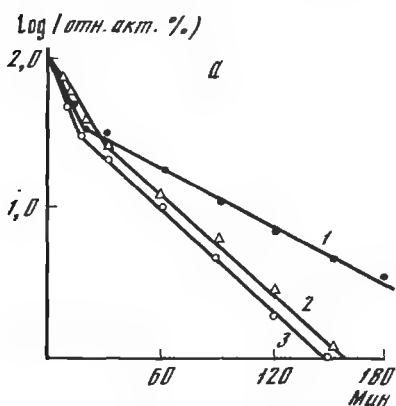


Рис. 15. Полулогарифмические анаморфозы кинетических кривых инактивации пероксидазы, выделенной из здоровых (1) растений табака сорта Ксанти нк (а) и Самсун 47/10 (б), а также из зараженных Х_т (2) и Х_у (3) штаммами Х-вируса и ВТМ (4) соответственно

Условия инактивации: 0,01 М натрий-фосфатный буфер (0,1 М KNO₃), pH 7,0 при 60°. Условия определения активности пероксидазы: 0,2 мМ о-дианизидин; 1 мМ H₂O₂; 0,01 М натрий-фосфатный буфер (0,1 М KNO₃), pH 7,0



температуре 60 и 72°. Для этой цели 3 мл раствора выделенного фермента вносили в специальные сосуды и инкубировали при pH 7,0 в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, содержащем 0,1 М KNO₃ при заданной температуре. Через определенные промежутки времени отбирали пробы объемом 0,15 мл и вносили в 5 мл 0,01 М натрий-фосфатного буфера (20°). В каждой пробе определяли пероксидазную активность по начальной скорости окисления о-дианизидина перекисью водорода. Увеличение оптической плотности раствора регистрировали при 460 нм. Из экспериментальной зависимости активности фермента от времени инкубации находили эффективную константу скорости первого порядка для инактивации пероксидазы, которая является мерой термической стабильности фермента [Угарова и др., 1977].

Активность пероксидазы, выделенной из растений табака сорта Ксанти, при 60° и pH 7,0 через 90 мин опыта сохраняется в контроле на 12,4% от первоначальной, а пероксидазы из инфицированных ВТМ растений табака — лишь на 5,1%. Такое снижение термостабильности свидетельствует о том, что вирусная инфекция оказывает существенное влияние, при котором изменяются физико-химические свойства фермента. Изучение тер-

Т а б л и ц а 15

Константа скорости термоинактивации ($K_{ин}$) пероксидазы, выделенной из листьев

Растения	Температура, °C	$K_{ин} \times 10^{-2}$, мин ⁻¹
Сорт Ксанти нк		
здоровые (контроль)	60	1,4
зараженные X_T -штаммом	60	2,5
X_y -штаммом	60	2,5
Сорт Самсун 47/10		
здоровые (контроль)	60	1,4
зараженные BTM	60	1,6
здоровые (контроль)	72	1,35
зараженные BTM	72	1,73

мической стабильности фермента, выделенного из здоровых и зараженных растений табака сорта Самсун 47/10, также показало неодинаковое влияние температуры на препараты фермента. Полулогарифмические анаморфозы зависимости активности пероксидазы от времени инкубации при повышенной температуре представлены на рис. 15.

Кривые термоинактивации [Воронова и др., 1981] имели сложную форму, и условно на кинетических кривых можно выделить два участка, соответствующие быстрой и медленной стадиям инактивации. В табл. 15 приведены величины константы скорости медленной стадии термоинактивации выделенного фермента. Сопоставление кинетических зависимостей скорости инактивации указывает на различия в термостабильности пероксидаз, выделенных из зараженных и контрольных растений (рис. 15, а, б). Термостабильность пероксидазы здоровых и вирусных (BTM) растений табака сорта Самсун 47/10 различалась не так резко, как для пероксидазы растений Ксанти (рис. 15, а). Константа скорости инактивации фермента из растений этого сорта как при 60°, так и при 72° была также несколько выше у зараженных растений, но ниже, чем у пораженных растений сорта Ксанти. Следовательно, как при системном (Ксанти + X_T или X_y), так и при некротическом (Самсун 47/10 + BTM) поражении вирусная инфекция приводит к понижению термоустойчивости фермента пероксидазы. Константа скорости тепловой инактивации пероксидазы контрольных растений оказалась одинаковой для исследуемых растений двух сортов табака (табл. 15).

Выше отмечалось, что при заражении растений табака разными вирусами у фермента пероксидазы изменяется относительное содержание различных изоформ (см. рис. 13), а также интенсивность проявления их активности с субстратом. Препараты фермента этих же растений обладают пониженной термостабильностью. При значительно более высокой активности пероксидазы зараженных растений сорта Ксанти нк инактивация фермента при нагревании идет почти в 2 раза быстрее, чем для пероксидазы контрольных растений.

Сведений о влиянии вирусной инфекции на термостабильность фермента пероксидазы нет. Известно лишь, что при поражении растений грибной инфекцией скорость инактивации этого фермента также повы-

Таблица 16

Константы Михаэлиса для пероксидазы табака сорта Ксанти, $M \cdot 10^{-4}$

Растения	pH 7,0		pH 5,0	
	ДН ₂	Н ₂ О ₂	ДН ₂	Н ₂ О ₂
Здоровые (контроль)	$0,75 \pm 0,06$	$6,80 \pm 0,03$	$0,48 \pm 0,04$	$13,10 \pm 0,08$
Зараженные X _y	$0,70 \pm 0,04$	$3,30 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,05$	$5,80 \pm 0,06$
Зараженные X _t	$0,58 \pm 0,05$	$4,10 \pm 0,02$	$0,29 \pm 0,02$	$8,70 \pm 0,07$

Таблица 17

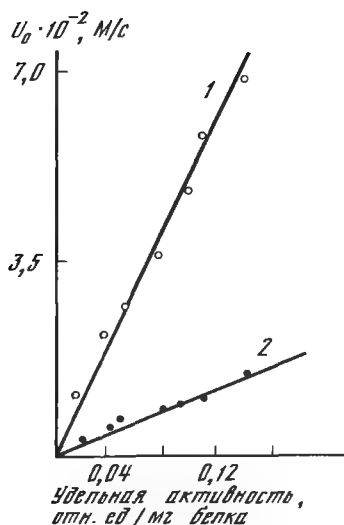
Константы Михаэлиса для пероксидаз растений табака сорта Самсун (сист.) при pH 7,0

Ткань	$K_m \cdot 10^{-4}, M$	
	о-Дианизидин	Н ₂ О ₂
Здоровая (контроль)	$0,76 \pm 0,03$	$4,80 \pm 0,01$
Зараженная ВТМ	$0,49 \pm 0,05$	$2,50 \pm 0,04$

шается [Кожанова, Аксенова, 1976]. Выделение и идентификация белков с пероксидазной активностью из вирусных и контрольных листьев свидетельствуют о возможной специфичности различий, выражающихся в изменении активности, изоэнзимного спектра, pH-оптимума и термостабильности фермента пероксидазы инфицированных растений-хозяев. Однако сущность и особенности изменения физико-химических свойств отдельных изопероксидаз под влиянием вирусной инфекции еще предстоит расшифровывать.

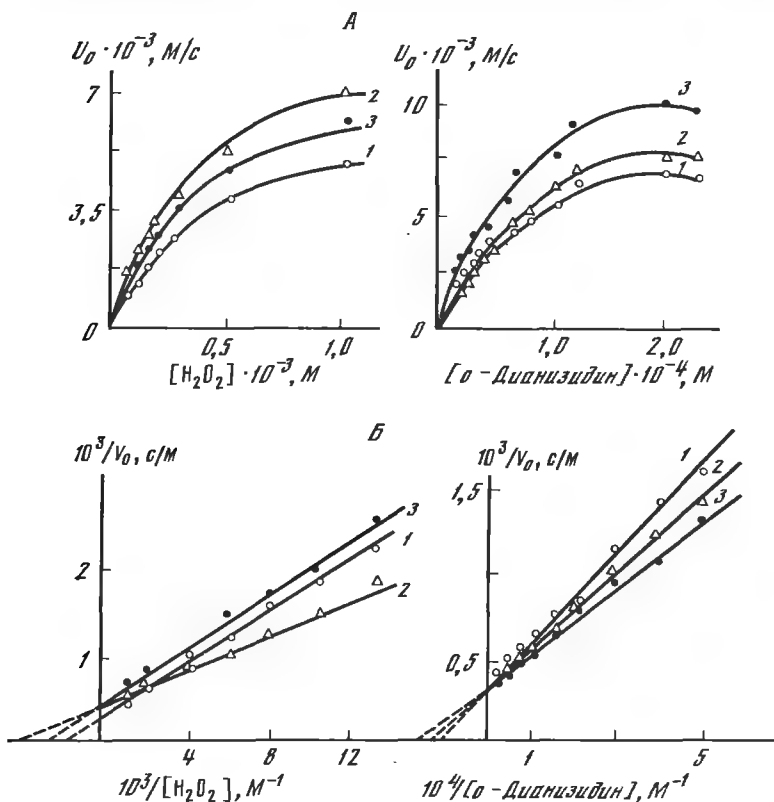
Кинетические свойства пероксидаз исследовали для фермента, выделенного из растений табака сортов Ксанти нк и Самсун (сист.), зараженных разными вирусами (ВТМ, X_t и X_y). Чтобы получить более полную характеристику фермента, активность пероксидазы определяли при pH 5,0 и 7,0, применяя в качестве субстрата о-дианизидин (ДН₂). Начальную скорость окисления ДН₂ (V_0) измеряли при 460 нм [Угарова и др., 1977]. Кинетику реакций снимали на двухлучевом спектрофотометре В-2-25 («Вексман», США). Константы рассчитывали по методу Лайнуивера—Берка. Константу Михаэлиса (K_m) для исследуемых пероксидаз получали из двух зависимостей: а) при постоянных концентрациях пероксидазы и ДН₂ и изменении концентрации Н₂О₂; б) при постоянных концентрациях пероксидазы и Н₂О₂ и изменении концентрации ДН₂.

На рис. 16 показана зависимость начальной скорости окисления о-дианизидина (V_0) от концентрации в интервале от 0,13 до 1,4 отн. ед. активности/мг белка пероксидазы при насыщающих концентрациях обоих субстратов. Прямая пропорциональная зависимость между V_0 и концентрацией фермента соблюдается для всех препаратов пероксидазы, исследованных в работе. В процессе реакции не происходит ассоциации или диссоциации ферментов на субъединицы, не образуются неактивные димеры и не сказывается влияние возможных примесей.



Р и с. 16. Зависимость начальной скорости окисления *o*-дианизидина от концентраций пероксидазы при рН 5,0 (1) и рН 7,0 (2), выделенной из растений табака сорта Ксанти нк

Р и с. 17. Зависимость начальной скорости окисления *o*-дианизидина от концентрации субстратов, катализируемого пероксидазой, выделенной из здоровых (1), зараженных X_y (2) и X_t (3) штаммами X -вируса картофеля растений табака сорта Ксанти нк в прямых величинах (А) и в координатах Лайнуивера—Берка (Б)



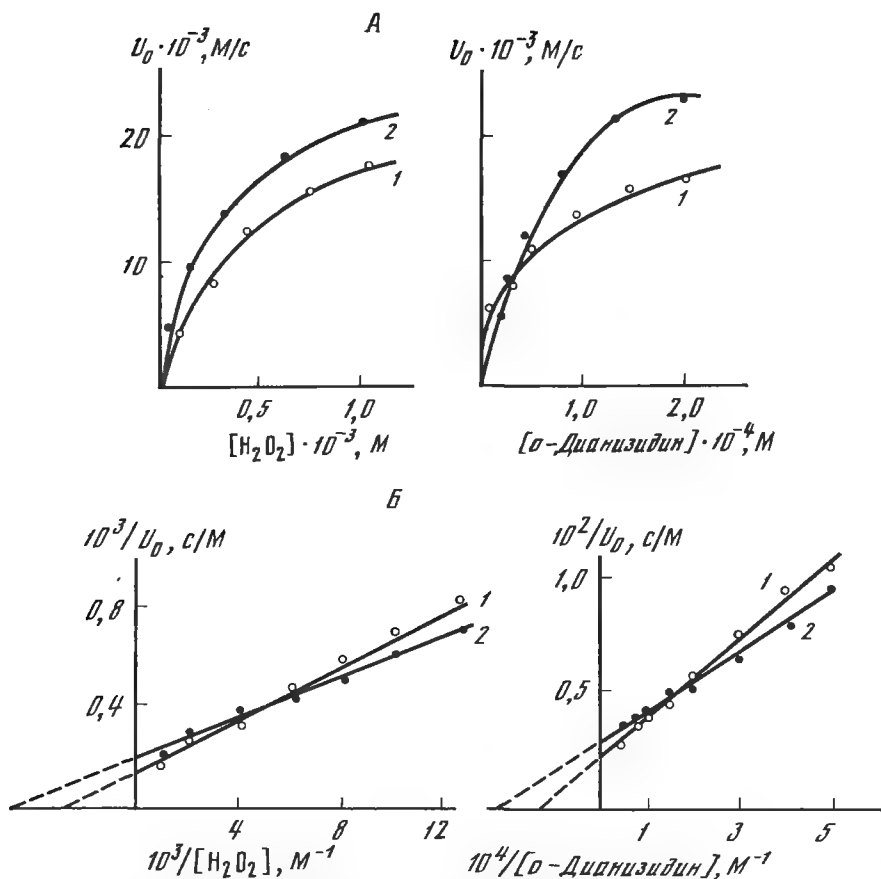


Рис. 18. Зависимость начальной скорости окисления *о*-дианизидина от концентрации субстратов, катализируемого пероксидазой, выделенной из здоровых (1) и зараженных ВТМ (2) растений табака сорта Самсун в координатах Лайнуивера—Берка

Условия те же, что и на рис. 17.

Зависимость начальной скорости окисления *о*-дианизидина при pH 7,0 от концентрации одного из субстратов при насыщающей концентрации другого для пероксидазы из здоровых и зараженных тканей табака сорта Ксанти и Самсун имеет гиперболический характер (рис. 17, 18). Аналогичный характер указанная зависимость имеет для пероксидазы растений табака сорта Ксанти при pH 5,0 [Воронова и др., 1981]. Обработка экспериментальных данных в координатах Лайнуивера—Берка позволила сделать вывод, что окисление *о*-дианизидина, катализируемое пероксидазой табака, подчиняется уравнению Михаэлиса—Ментен. Константы Михаэлиса для различных пероксидаз были получены из двух вариантов зависимостей: 1) не меняли концентрацию пероксидазы или DN_2 , но меняли количество H_2O_2 (рис. 17, 18,

слева); 2) не меняли концентрацию пероксидазы и H_2O_2 , но изменяли содержание DH_2 (рис. 17, 18, справа).

В табл. 16 и 17 представлены числовые значения K_m для пероксидазы здоровых и зараженных растений табака двух сортов, вычисленные из их линейных зависимостей для каждого из субстратов. Из данных таблиц видно, что вирусная инфекция оказывает влияние, в результате которого снижаются величины константы Михаэлиса для пероксидаз как при pH 7,0, так и при pH 5,0. Величина K_m снижается по *o*-дианизидину на 20—40% и по H_2O_2 на 30—40% для растений табака сорта Самсун, зараженных ВТМ, и растений сорта Ксанти нк, зараженных сильновирulentным штаммом X₇ВК. Имеет место уменьшение этой величины и для растений, зараженных слабовирulentным штаммом этого вируса (см. табл. 16).

Понижение K_m для исследуемых пероксидаз подтверждает существенные изменения биохимических свойств фермента в растениях, пораженных вирусами. Подобное было отмечено для пероксидазы капусты, зараженной грибной инфекцией (*Botrytis cinerea*), в качестве субстратов использовались пирогаллол, гваякол и флороглюцин [Кожанова, Аксенова, 1976]. Имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что фермент пероксидаза может менять свои каталитические свойства под влиянием заражения растений-хозяев патогенами, а снижение K_m для пероксидазы инфицированных растений происходит в результате повышения ее сродства к субстратам.

6.4. АНИОННЫЕ ИЗОЭНЗИМЫ ПЕРОКСИДАЗЫ РАСТЕНИЙ КСАНТИ НК

Характеристика суммарных пероксидаз, выделенных из вирозных и контрольных растений табака, свидетельствует о различиях между ними по скорости инактивации этого фермента, чувствительности к изменениям pH среды и специфичности сродства к различным субстратам. Выше мы подробно рассмотрели данные о том, что в растущих тканях листьев вирозных растений значительно повышается уровень активности многих изоэнзимов, и особенно характерно это для анионных изопероксидаз. Остается повышенной активность этих изоэнзимов и во вновь отрастающих листьях зараженных растений табака сорта Ксанти нк. Поэтому изменение свойств суммарного препарата могло отражать изменение

Т а б л и ц а 18

Результаты очистки пероксидазы табака сорта Ксанти нк после гель-фильтрации

Растения	Активность, отн. ед./мг белка		Степень очистки
	Исходный препарат	После G-100	
Инфицированные ВТМ	275	17 220	60,4
Здоровые (контроль)	119	7 715	64,8
Инфицированные/здоровые	2,2	2,2	—

свойств и соотношение индивидуальных изоэнзимов. Следовательно, целесообразно выделить отдельные молекулярные формы этого фермента, и именно те, которые после электрофореза в полиакриламидном геле и при фокусировании на ПАГ-пластинках появлялись раньше контрольных и, следовательно, обладали более высокой активностью к таким субстратам, как бензидин, *о*-дианизидин и гваякол. В дальнейшем и была предпринята многоступенчатая очистка фермента пероксидазы до индивидуальных изоэнзимов согласно представленной схеме.

Схема выделения и очистки анионных изоэнзимов пероксидазы растений табака сорта Ксанти нк

500 г листьев + жидкий азот + 0,05 М трис-HCl буфер, pH 7,4 (1:1). Настаивание, высаливание до 40% насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, осадок отбросить.

Супернатант до 80% насыщения, осадок растворить в 30%-ном р-ре сульфата аммония. Центрифугирование, VAC 1 ч, 40 000 g. Осадок отбросить.

Высаливание до 80% насыщения, центрифугирование 30 мин, 16 000 g. Осадок растворить в 0,05 М исходном буфере. Гельфилтрация на G-100, G-200, супернатант до 80% насыщения.

Центрифугирование 30 мин, 16 000 g, осадок растворить в 0,001 М ацетатном буфере, pH 4,6. Ионообменное хроматографирование на ДЭАЭ-сефадексе А-50: ацетатный буфер + NaCl (0,2—0,6 М). Хроматографирование на СМ-сефадексе С-50 (3×50 см), 0,05 М ацетатный буфер, pH 4,8. Элюирование в градиенте pH 4,6—5,0 того же буфера.

Все операции при температуре +4°

Определения: белок по Лоури, активность по Бояркину. Электрофорез в полиакриламидном геле. Изоэлектрофокусирование на ПАГ-пластинках, pH 3,5—9,5. Определение субстратной специфичности, молекулярной массы, ИКС, состава сахаров и др.

После всех этапов очистки лиофильно высушенный препарат анионных изопероксидаз составлял 10—12 мг, т. е. 0,02% от первоначальной массы.

При выделении ферментных белков все этапы очистки должны сохранять фермент в неизменном, приближенном к нативному состоянию. Профиль элюции пероксидазы после разделения на G-100 представлен на рис. 12. В табл. 18 и 19 приведены данные поэтапной очистки и соотношение очищенных препаратов из здоровых и зараженных ВТМ растений табака сорта Ксанти нк. После гель-филтрации методом изоэлектрофокусирования на ПАГ-пластинках было идентифицировано по 8 изопероксидаз для листьев как вирусных, так и контрольных растений табака. Изоэлектрические точки белков с пероксидазной активностью лежали в широком диапазоне pH — от 3,6, где фокусировался самый кислый изоэнзим, до 9,8 (точка фокусирования самого щелочного изоэнзима).

Интенсивность окраски изопероксидаз на электрофореграммах, по-

Таблица 19

Активность пероксидазы (в отн. ед./мг белка), выделенной из растений табака сорта Ксантинк

Растения	Исходный буфер, pH 7,4	Исходный буфер + 0,2 М NaCl
Инфицированные ВТМ	22 727	12 860
Здоровые (контроль)	10 376	6 510
Инфицированные/здоровые	2,2	2,0

лученных для препаратов вирозных растений, была значительно ярче, чем для контрольных. Доминирующими среди выявленных изоэнзимов были две анионные изопероксидазы с изoeлектрическими точками 3,6 и 3,8. При окрашивании ПАГ-пластинок в бензидине и последующем выдерживании их в растворе перекиси водорода именно эти изопероксидазы вирозных растений проявлялись раньше контрольных и всех других изоэнзимов. Согласно табл. 18, пероксидазная активность очищенных препаратов из инфицированных растений была в 2,2 раза выше контроля. Отношение активностей опыт/контроль оставалось неизменным и после очистки фермента на сефадексе G-100.

Дальнейшая очистка пероксидазы проводилась на ионообменнике ДЭА-сефадексе А-50. Не удерживаемые ионообменником белки снимались исходным буфером, затем для элюирования использовали ступенчатый градиент буфера с добавлением хлористого натрия. При изменении ионной силы буфера элюировались искомые анионные изопероксидазы. Каталитическая активность этих пероксидаз с бензидином для вирозных растений оставалась в 2 раза выше контрольной (табл. 19). На рис. 19 дан спектр пероксидаз, элюируемых с колонки исходным буфером (а), и двух анионных изоэнзимов фермента (б), элюируемых буфером с добавлением 0,2 М NaCl. Спектр, приведенный на рисунке, соответствует только изопероксидазам вирозного растения, так как он для изоэнзимов пероксидазы здорового растения был идентичным.

Для более детальной очистки анионных изопероксидаз была принята ионообменная рехроматография на CM-сефадексе С-50, который, удерживая другие белки, способствовал очистке анионных пероксидаз. Для элюции использовали ацетатный буфер pH 4,6—5,0. Как свидетельствуют данные табл. 20, удельная активность анионных пероксидаз после очистки на CM-сефадексе С-50 значительно возросла и составляла для вирозных растений 180 844, а для контрольных — 118 515 отн. ед./мг белка. Сопоставляя пероксидазную активность исходного экстракта (после высаливания сульфатом аммония) с конечной активностью анионных пероксидаз, выделенных из вирозных и контрольных растений табака, видно, что фермент после всех этапов выделения был очищен более чем в 900 раз. Если отнести активность очищенного фермента к активности в ткани исходных листьев (см. табл. 12), то эта цифра будет еще на порядок выше.

Каталитическая активность анионных пероксидаз, выделенных из инфицированных растений, была в 1,5 раза выше контроля. Эта активность «вирозных» изопероксидаз является доказательством того, что,

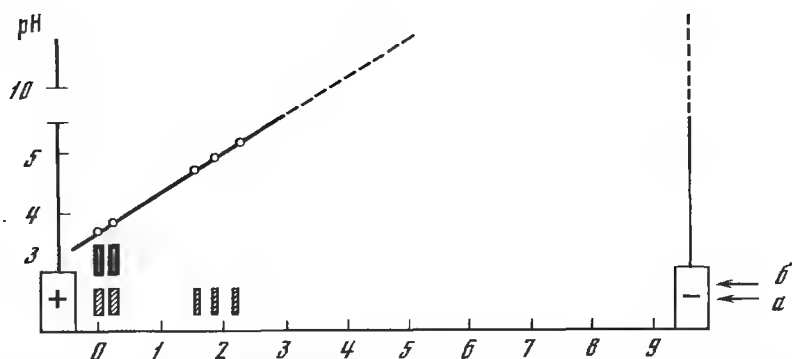


Рис. 19. Схема изоэлектрофокусирования на ПАГ-пластинке белков с пероксидазной активностью, выделенных из растений табака, зараженных ВТМ, после хроматографирования на ДЭАЭ-сефадексе А-50
а — исходный буфер, pH 7,4; б — буфер + 0,2 М NaCl

несмотря на сложный путь выделения и очистки фермента, повышение активности, обусловленное проявлением вирусиндуцированной устойчивости, в процессе очистки не изменилось. Изоэлектрофокусирование показало, что и опытный и контрольный препараты содержали по две анионные пероксидазы с очень близкими изоэлектрическими точками, в области pH 3,6 и 3,8. С этими изоэнзимами и были проведены дальнейшие исследования по изучению их физико-химических свойств.

Физико-химическая характеристика изоэнзимов. Так как выделенные нами две кислые изопероксидазы фокусируются на ПАГ-пластинках с амфолинами в очень узкой зоне pH, то последующая процедура их разделения на индивидуальные компоненты весьма затруднительна. Поэтому физико-химические характеристики были получены общие для этих двух изоэнзимов.

Определение моносахаров. Пероксидаза является ферментом гликопротеидной природы, имеющим в своем составе сравнительно большой углеводный «хвост», который, прикрывая белковую часть молекулы,

Таблица 20

Результаты очистки пероксидазы табака сорта Ксантиик

Этап	Белок, мг/мл		Активность, отн. ед./мг белка		Степень очистки	
	Здоровые	Зараженные	Здоровые	Зараженные	Здоровые	Зараженные
Центрифугирование, 40 000 g	10,60	9,0	123	193	1	1
Гель-фильтрация, G-200	0,51	0,47	10 182	19 688	83	100
Рехроматография, CM-сефадекс	0,16	0,15	118 515	180 844	960	940

стабилизирует ее. Известно также, что изменение термостабильности пероксидазы может происходить в результате изменений в углеводной части изоэнзимов. Все это обосновывает необходимость изучения качественного и количественного состава углеводов пероксидазы табака для выяснения причин увеличения активности у пероксидаз зараженных растений.

Определение и расшифровка углеводной части анионных пероксидаз были проведены по двум методам после предварительного ацетилирования сахаров.

Хроматографию проводили на бумаге Filtrak FN-3 в системе растворителей *n*-бутанол:пиридин:вода (6:4:3). Для обнаружения моносахаров и аминокислот использовали щелочной раствор азотнокислого серебра и 0,2% раствор нингидрина в ацетоне. Газожидкостную хроматографию проводили на хроматографе Pye-Unicam 104 с пламенно-ионизационным детектором на стеклянных колонках А·(150·0,4 см), содержащих 3% QE-1 на газохроме Q (100—120 меш). Моносахара анализировали в виде ацетатов полиолов (175—225°, 5°/мин).

Методом бумажной и газожидкостной хроматографии установлено, что изучаемые анионные изопероксидазы содержат в своем составе следующие моносахара: альдопентозу — фукозу; альдогексозы — маннозу, глюкозу и галактозу; кетогексозу — фруктозу. Следовательно, выделенные изоэнзимы являются истинными гликопротеидными белками, в состав которых обязательно входят углеводные компоненты. Качественный состав моносахаров был идентичен для «виридных» и контрольных изопероксидаз.

Необходимо отметить, что широко распространенные в природе и присутствующие в молекулах изоэнзимов пероксидазы хрена такие аминокислоты, как глюкозамин и галактозамин, а также галактуроновая кислота не были обнаружены в составе углеводной части анионных изопероксидаз, выделенных как из виридных, так и из контрольных растений табака сорта Ксанти нк. Количественное содержание каждого из сахаров углеводной части этих пероксидаз пока не определено, но было высчитано отношение суммы углеводов к белковому компоненту и к другим показателям молекулы пероксидазы. Оказалось, что у сравниваемых гликопротеидов это отношение составляет 2,43 для пероксидаз, выделенных из зараженных растений, и 3,15 для контрольных (табл. 21).

Таким образом, в составе контрольных пероксидаз углеводов содержалось почти в 2 раза больше, чем в изоэнзимах виридных растений. В обратной корреляции с сахарами находится содержание неорганических компонентов. Эти показатели подтверждают необходимость детального сравнительного изучения состава молекул пероксидаз виридных и контрольных растений. Анализ органической и неорганической части пероксидаз свидетельствует о том, что препарат из виридных растений содержит меньше органических, но в 2 раза больше зольных элементов. Также установлено, что на 78,18% органических соединений в составе пероксидаз виридных растений 51% составляют неизвестные органические компоненты. Если пероксидазы виридных растений в своем составе имеют какие-то органические соединения и ясно, что это не сахара, то выяснение их природы и состава представляет определенный научный интерес.

Таблица 21

Содержание белка, сахаров, органических и неорганических соединений (в %) в составе анионных изопероксидаз

Растения	Белок (1)	Моно- сахара (2)	Отноше- ние (1/2)	Неизвестные органические	Всего	
					органи- ческих	неоргани- ческих
Инфицирован- ные ВТМ	19,23	7,9	2,43	51,05	78,18	21,82
Здоровые (контроль)	48,39	15,36	3,15	24,69	89,44	11,56

Можно предполагать, что такими соединениями могут быть фенолы, которые образуют с молекулой пероксидазы комплексы и при этом активируют каталитическую деятельность фермента. Данные табл. 21 могут косвенно свидетельствовать о перестройке «лабильных» участков молекул фермента под влиянием вирусной инфекции.

Гем-протеиновая связь зарегистрирована с помощью метода Маэли [Maehly, 1952]. Разрыв связи осуществлялся при смешивании в делительной воронке равных объемов метил-этил-кетона и раствора препарата анионных пероксидаз при подкислении смеси 0,1 М HCl до кислой реакции — pH от 2,0 до 1,5. В этих условиях опыта начинается быстрое отщепление апофермента от протогемина. Потерю ферментативной активности проверяли, определяя активность фермента до и после опыта по реакции с одним из субстратов — бензидином. После разрыва указанной связи в кислой среде пероксидазная функция фермента полностью утрачивалась. Таким образом, было получено доказательство наличия гем-протеиновой связи у исследуемых анионных изоэнзимов фермента. Потеря активности установлена как для опытных, так и контрольных пероксидаз, следовательно, мы имели дело с истинными пероксидазами, содержащими в составе молекулы геминую группировку (см. 1.2).

Определение молекулярной массы проводили методом диск-электрофореза на основании относительной подвижности белков в зависимости от концентрации полиакриламидного геля [Hedrick, Smith, 1968]. Согласно расчетам по таблице, предложенной Г. А. Бузун [1976], масса исследуемых анионных изопероксидаз была одинаковой для «вирусных» и контрольных изоэнзимов, так как тангенс угла наклона линии регрессии был совершенно одинаков как в опыте, так и в контроле (рис. 20). На рисунке представлена зависимость относительной подвижности анионных изопероксидаз от концентрации акриламида в гелях. Проведенный расчет показывает, что их молекулярная масса равна 45—46 кДа.

Инфракрасные спектры. Метод инфракрасной спектроскопии (ИКС) является весьма эффективным для изучения особенностей биологических объектов, так как ИКС препаратов дает общий вид спектров поглощения для химических структур [Андреева и др., 1985]. Для биохимических исследований часто применяют спектроскопию пропускания с использованием прессованных таблеток с KBr для выявления в полипептидной цепи постоянных и переменных участков белковой

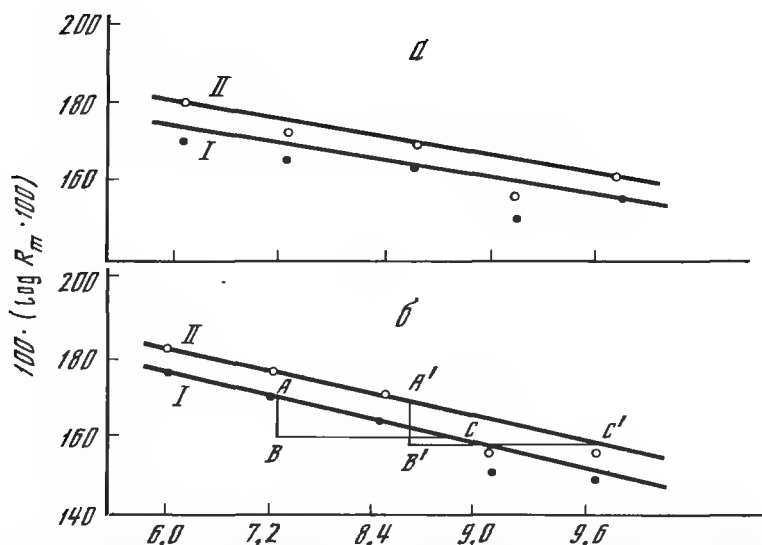


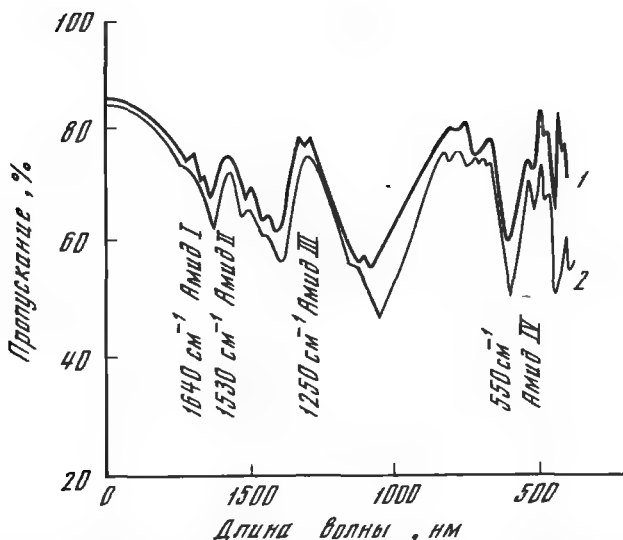
Рис. 20. Зависимость относительной подвижности анионных изоэнзимов (ИЭТ=3,6 и 3,8) от концентрации полиакриламидного геля: АВ/ВС=А'В'/В'С'=6,1

а — инфицированные; б — здоровые (контроль) растения табака сорта Ксаити нк

молекулы [Смит, 1982]. Спектры почти всех белков в области длин волн $500\text{--}4000\text{ см}^{-1}$ обусловлены колебаниями пептидных групп и имеют несколько характерных полос поглощения.

Нами использован метод таблетирования исследуемых образцов с КВг и последующей регистрации спектров поглощения в широком диапазоне длин волн с записью в двух режимах на инфракрасном спектрофотометре UR-10 (ГДР). Так как фермент пероксидаза является белком гликопротеидной природы, то запись спектров проведена в пределах $400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$ при щелевой программе 4. Скорость регистрации спектров поглощения $50\text{ см}^{-1}\cdot\text{мин}^{-1}$ [Ладыгина, 1975]. Сравнительный анализ полос поглощения анионными пероксидазами инфицированных и здоровых растений показал, что их спектры различаются. Так, в области Амид IV наблюдаются существенные изменения полосы поглощения при 550 см^{-1} (рис. 21). Значительные изменения спектра заметны в области «углеводной» полосы поглощения при $900\text{--}1170\text{ см}^{-1}$. Такой результат подтверждает приведенные выше данные об изменениях количественных соотношений углеводного состава исследуемых пероксидаз.

Отмечены изменения полос поглощения для Амидов III, II и I. Так, для исследуемых изопероксидаз обнаружены некоторые смещения полос поглощения при 1250 см^{-1} и дальше к области Амид II. Изменение полос поглощения при 1640 см^{-1} может быть обусловлено изменениями CN-конформации белковой молекулы. Для пероксидазы, выделенной из листьев инфицированных растений, возможен также сдвиг полосы,



Р и с. 21. Инфракрасные спектры поглощения анионными изопероксидазами, выделенными из здоровых (1) и зараженных ВТМ (2) растений табака сорта Ксантик

характеризующей α -спираль в области 1655 см^{-1} . Полученные данные могут служить показателем конформационных изменений в полипептидной цепи молекул анионных пероксидаз и указывать на их различия. Таким образом, для «вирусных» пероксидаз (рис. 21, 2) в области $500\text{—}2000\text{ см}^{-1}$ имеются некоторые отличия от спектра контрольной пероксидазы, что может отражать изменения вторичной структуры молекул анионных изоэнзимов, обеспечивая тем самым высокую их активность в зараженных вирусами растениях.

Субстратная специфичность изоэнзимов. Установлено, что изменения в каталитических свойствах изоэнзимов обусловлены различиями в первичной структуре молекул изопероксидаз. В норме для пероксидазы растений табака эти различия проявляются в составе аминокислот и сахаров [Mäder, 1980; Mäder et al., 1980, и др.]. Биохимическая характеристика пероксидаз, выделенных из вирусных и контрольных растений табака, показала определенные различия между ними по каталитическому действию на субстраты [Алябьева и др., 1983; Андреева и др., 1979; Андреева, Омельченко, 1986]. Вирусная инфекция, оказывая влияние на изопероксидазы растений табака, способствует снижению величин константы Михаэлиса по отношению к контрольной пероксидазе [Воронова и др., 1981]. Эти различия находят свое отражение в соотношении углеводной и белковой части молекул и служат причиной изменения активности пероксидаз зараженных растений.

Субстратную специфичность анионных пероксидаз исследовали, определяя спектрофотометрически величину поглощения продуктов реакции с применением субстратов естественной (хлорогеновая и кофейная кислоты) и искусственной (о-дианизидин, бензидин, пирогаллол и гваякол) при-

Т а б л и ц а 22

Скорость окисления субстратов анионными изопероксидазами растений табака сорта Ксанти нк

Субстраты	Здоровые		Инфицированные		Инфициро- ванные/ здоровые
	D	A	D	A	
o-Дианизидин	0,02	88,13	0,03	108,0	1,23
Гваякол	0,04	0,89	0,09	1,8	2,00
Пирогаллол	0,05	10,25	0,07	17,0	1,66

D — опт. плотность, 20 с; A — активность, мкМ/мин·мг белка.

роды. На основании коэффициентов экстинкции, которые равны $2,47 \text{ см}^{-1} \cdot \text{мМ}^{-1}$ для пирогаллола, $26,6 \text{ см}^{-1} \cdot \text{мМ}^{-1}$ для гваякола и $3 \cdot 10^4 \text{ см}^{-1} \cdot \text{мМ}^{-1}$ для o-дианизидина, рассчитывали скорость реакции фермент—субстрат. Было установлено, что окисление этих субстратов анионными пероксидазами вирозных растений идет в 1,5—2 раза быстрее, чем для контрольных пероксидаз.

В табл. 22 представлены данные по окислению искусственных субстратов анионными пероксидазами. Так, при одинаковом количестве взятого белка наибольшую активность проявляют сравниваемые изопероксидазы с o-дианизидином, затем идет пирогаллол и гваякол. Гваякол является субстратом, который окисляет только пероксидаза. Показано, что при окислении гваякола контрольной пероксидазой скорость реакции равна 0,89 мкМ/мин·мг белка, а для пероксидазы вирозных растений она в 2 раза выше и равна 1,8 мкМ/мин·мг белка. Для пирогаллола и o-дианизидина скорость также выше у изоэнзимов зараженных растений. Высокая скорость окисления субстратов пероксидазами инфицированных растений, естественно, обусловлена более активным их состоянием.

Анионные пероксидазы вирозных растений занимают ключевое положение в листьях, обладающих вирусиндуцированной системной устойчивостью. На единицу белка активность этих изоэнзимов в 1,5—2 раза выше контроля. Она остается высокой в молодых, отрастающих листьях и после того, как опадут зараженные нижние листья. Присутствие и активность фермента контролируются концентрацией конечного продукта. Увеличение продукта снижает синтез фермента, и наоборот. В основе такого механизма лежит принцип экономии, т. е. выбор наиболее выгодного пути использования материала и энергии. Организм, поддерживающий активность определенных изоэнзимов, должен либо синтезировать дополнительное количество необходимых изоэнзимов, либо максимально активизировать их деятельность.

Каталитическая функция выделенных нами анионных пероксидаз не связана с увеличением количества ферментного белка, за счет которого шло бы повышение активности. Отсутствует также и синтез этих пероксидаз *de novo*, так как изоэнзимы с такой же изоэлектрической точкой присутствуют в достаточном количестве в контрольных листьях здоровых растений. К тому же количественные соотношения присутствующего

в клетке ферментного белка не могут изменяться в широких пределах. Для этого необходима экспрессия соответствующего гена или нескольких генов. Это и понятно, так как сам по себе синтез любого белка весьма энергоемкий процесс, требующий строгого контроля со стороны деятельности генома клетки. Поэтому в живом организме большую роль играют микроокружения как молекулы фермента в целом, так и его активного центра. Изменение микроокружения — более выгодный путь в любой стрессовой ситуации, и лишь только затем растение может мобилизовать свои ресурсы на синтез необходимого в данный момент белка.

Наши данные свидетельствуют о том, что не синтез определяет повышение активности исследуемых изопероксидаз. Соотношение углеводной, белковой и небелковой частей молекул анионных пероксидаз различается в опыте и контроле (табл. 21). В данном случае может происходить как изменение микроокружения активного центра, так и изменение конфигурации молекул за счет отщепления каких-то составляющих, что и обеспечивает значительное повышение активности этих изопероксидаз. Известно, что специфичность по отношению к субстратам определяется белковой компонентой фермента. Данные таблицы дают основание сделать вывод о значительной перестройке молекул анионных пероксидаз, так как на единицу веса содержание белка в препаратах инфицированных растений в 2,5 раза ниже, чем в контроле. Значительно снижено в их составе и содержание сахаров. Таким образом, изменения в составе молекул анионных изoenзимов могут быть определяющими для проявления максимального каталитического акта в тканях с вирусиндуцированной системной устойчивостью.

ГЛАВА 7

УЧАСТВУЕТ ЛИ ПЕРОКСИДАЗА В ЗАЩИТНОМ МЕХАНИЗМЕ?

Важной проблемой современной биологии является индуцирование механизмов противовирусного иммунитета растений, направленных на снижение повреждающего действия патогена. Именно ограничение репродуктивной активности возбудителя и есть результат действия защитных механизмов. Развитие и исход инфекционного процесса зависят от трех основных факторов: физиолого-биохимического состояния макроорганизма, активности его защитных реакций, особенностей размножения патогена и особенностей проявления «антагонистических взаимоотношений» между вирусом и растением-хозяином. Вирус, попадая в клетки растений, индуцирует появление так называемых «патогенезозависимых» белков, тесно связанных с устойчивостью [Harrison, 1982]. За последние 15 лет исследования многих авторов так или иначе были посвящены изучению синтеза и роли этих белков в метаболизме вирозных растений [Gianinazzi et al., 1970; Loon, Kammen, 1970; Kassanis et al., 1974; Gianinazzi, Martin, 1975; Loon, 1975, 1976a; Antoniow et al., 1980; Kassanis, 1981; Jamet et al., 1985].

Среди естественных ингибиторов, подавляющих репродукцию вирусов на раннем этапе патогенеза, все чаще называют интерфероподобные белки растений [Antoniw et al., 1980; Kassanis, 1981; Loon, 1982]. В отличие от истинных интерферонов [Baglioni, 1979] у растений интерфероподобные белки присутствуют более длительное время, но пока неизвестно, каким образом включается этот защитный механизм и как он осуществляется на молекулярном уровне. Один из таких белков обладает очень сильным антивирусным действием [Sela, 1981], имеет гликопротеидную природу и каким-то образом связан с функцией гена N. В связи с этим важен тот факт, что пероксидаза также является белком гликопротеидной природы, а углеводный компонент, как известно, регулирует специфичность белковой части молекулы [Туманова, 1978].

Роли фермента пероксидазы в метаболизме больного растения посвящено большое количество работ (см. обзоры: [Омельченко, Андреева, 1976; Gaspar et al., 1982] и др.), однако ее участие в защитных реакциях пораженных растений продолжает привлекать внимание многих исследователей, так как повышение активности этого фермента коррелирует с устойчивостью, запрограммированной самим организмом. Становится очевидным, что пероксидаза катализирует такой тип реакций, который является основным в окислительно-восстановительных процессах зараженных организмов, и этим обусловлено повышение ее активности.

Метаболизм пероксидазы и фенольных соединений тесно взаимосвязан, и, следовательно, повышение активности фермента в листьях, обладающих вирусиндуцированной устойчивостью, должно отражать изменения в содержании субстратов — соединений фенольной природы. Наиболее детально изучены состав ферментов и образование фенолов в местах локализации вирусных частиц, в области некрозов сверхчувствительных растений-хозяев. Так, в 70–80-е годы особенно интенсивно исследовалось участие трех ферментов в формировании местных поражений: пероксидазы, полифенолоксидазы и фенилаланин-аммиак-лиазы. В зоне образования некрозов (см. 4.2) аккумулируются фенольные соединения, которые окисляются до токсичных хинонов. Высказывалось предположение, что сами хиноны служат медиаторами для активирования пероксидазы и полифенолоксидазы.

Однако, несмотря на сравнительно большое количество работ, посвященных этим вопросам, до сих пор нельзя со всей определенностью сказать, что является причиной, а что следствием процесса некрозообразования. Пока ясно, что как при образовании самого некроза, так и на значительном расстоянии от него повышается активность фермента пероксидазы и это увеличение активности идет параллельно с формированием приобретенной устойчивости [Vegetti et al., 1975]. Чтобы понять, какой из трех ферментов играет наиболее важную роль в некрозогенезе, эти исследователи провели опыты с бобовыми растениями, инфицируя их вирусом мозаики люцерны. Авторы пришли к выводу, что, вероятно, пероксидаза в клетках устойчивых растений играет гораздо большую роль, а не только участвует в локализации вирусной инфекции. Активизация полифенолоксидазы в местах образования некрозов является вторичным эффектом, так как нет прямой зависимости между образованием некрозов и повышением активности этого фермента.

Было показано, что при проявлении вирусиндуцированной системной устойчивости в инокулированных устойчивых листьях не отмечено повышение активности фенилаланин-аммиак-лиазы и полифенолоксидазы [Loon, Geelen, 1971; Fritig et al., 1973]. Установлено также, что механическое повреждение, вызванное натираем листовой поверхности карборундом, не вызывает системной устойчивости и что системная устойчивость индуцируется только вирусной инфекцией [Conti et al., 1978]. Как считает Бэлл [Bell, 1981], как при образовании некрозов, так и при проявлении вирусиндуцированной устойчивости указанные выше ферменты выполняют определенную функцию.

Изменения в содержании фенольных соединений авторы часто связывают с процессом лигнификации, объясняя этим защиту растений от проникновения и распространения патогенов. Большинство работ посвящено изучению механизма активной защиты растений при поражении их грибными заболеваниями [Метлицкий и др., 1972; Богдан, 1981; Метлицкий, Озерецковская, 1981; Дьяков, 1983; Sohi, Raval, 1983; Harms, Tegebea, 1984; Malmberg, Theander, 1984 и др.]. Причем роль лигнификации при взаимодействии растение—гриб действительно велика [Vance et al., 1980]. Но при вирусном поражении образование лигнина в местах формирования некрозов не определяет проявления системной устойчивости в молодых, растущих листьях, в которых участвует пероксидаза.

Конти и др. [Conti et al., 1982] нашли, что у растений *Nicotiana glutinosa*, инфицированных ВТМ, после появления некрозов активируются две изопероксидазы с R_m 0,47 и 0,14. При этом активирование изоэнзима с подвижностью 0,14 прямо коррелировало с суровостью некротического поражения. Ранее американские ученые идентифицировали катодный изоэнзим пероксидазы — C_2 , который был ответственным за образование некроза [Sheen, Diachun, 1978a]. При скрещивании этот изоэнзим был передан потомству, которое при заражении вирусом приобретало реакцию сверхчувствительности. Убедительно показано, что изопероксидазы с подвижностью 0,14 и 0,23 активизируются в устойчивых тканях после инокуляции и параллельно с развитием системной устойчивости [Conti et al., 1982]. Авторы полагают, что пероксидаза непосредственно не включается в защитный механизм, но может играть важную роль в биохимических процессах, ведущих к формированию индуцирующего фактора, который вызывает механизм устойчивости.

Как показали наши исследования, функционально активное состояние пероксидазы может продолжаться до 30—40-го дня после заражения. Это свидетельствует о продолжительной напряженности метаболических процессов в клетках инфицированного растения. В таком случае не является ли повышение активности пероксидазы и проявление приобретенной устойчивости своего рода выражением «иммунологической памяти»? В животной иммунологии сравнительно давно появилось выражение «иммунологическая память», означающее настороженность организма к антигенам, ранее попадавшим в клетки. У животного первая встреча, например, с вирусом может дать очень сильный иммунологический эффект, такой, что организм всю жизнь «на всякий случай» будет вырабатывать антитела к этому антигену. И такой ответ хозяина в распознавании

«своего» и «чужого» строится на основе долговременной памяти антител к антигенам.

У растений нет специализированных органов иммунной системы (лимфоцитов и антител), но растительные клетки также способны распознавать «свое» и «чужое» и отторгать генетически чужеродное, что эволюционно не является для них нормой. Процесс обезвреживания и утилизации всего чуждого растительному организму является результатом сложного многоступенчатого течения физиолого-биохимических процессов. У растений существует определенная автономность органов, тканей и клеток, однако у них есть структурные и метаболические системы, координирующие взаимодействие отдельных частей растительного организма в целом. Немаловажную роль в этом играет фитоиммунологический контроль, который регулирует процессы, определяющие исход встречи хозяин—патоген.

Среди ферментов, участвующих в регуляции метаболизма, не последнюю роль играет пероксидаза. Этот фермент можно определить как антителоподобный белок, реагирующий на любое изменение окружающей среды и на любые стрессовые ситуации. А само присутствие в клетках фермента с широким спектром действия только подчеркивает важность его каталитической функции для метаболизма растительных тканей. Как показано выше, увеличение активности пероксидазы может происходить при активировании одного или нескольких изоэнзимов. Следовательно, если изоэнзим активируется, то он должен при этом проявлять повышенное сродство к определенному субстрату, а субстрат соответственно должен присутствовать и по типу обратной связи индуцировать или ингибировать (аллостерическое торможение) деятельность изоэнзима, который присутствует в данный момент в активно функционирующей системе организма. Чтобы система функционировала, должен быть пусковой механизм, определяющий, какой изоэнзим необходим в данный момент в активной форме.

В растениях табака сорта Ксанти нк при заражении нижних листьев ВТМ в верхних, молодых активизируется деятельность двух анионных изопероксидаз [Андреева, 1981], активность их в отрастающих листьях удерживается длительное время на высоком уровне. В связи с этим возникают два вопроса: первый — какие соединения индуцируют синтез и обновление именно анионных изоэнзимов? и второй — какие субстраты претерпевают окислительно-восстановительные изменения с участием этих пероксидаз, обеспечивая прохождение той или иной химической реакции? При длительном проявлении вирусиндуцированной системной устойчивости должен запускаться механизм, регулирующий синтез и обновление ферментного белка. Сведений о том, как идет обновление молекул пероксидазы, очень мало, и они не раскрывают сути вопроса [Gayer, Glaszion, 1968].

Выделенные анионные изопероксидазы вирузных растений существенно отличаются от таких же изоэнзимов контрольных растений по ферментативной специфичности при взаимодействии с субстратами естественной и искусственной природы (см. 6.4). У них повышенное сродство к субстратам, что должно иметь соответствующий контроль со стороны клетки. Если в начале заболевания, при образовании некротов, индукторами

местной устойчивости могут выступать фитогормоны, то, очевидно, при возникновении вирусиндуцированной системной устойчивости включается и какой-то другой механизм, обеспечивающий длительное поддержание молекул фермента в активном состоянии.

В гипотезе о роли фермента пероксидазы в проявлении устойчивости, сформулированной Симонсом и Россом [Simons, Ross, 1970, 1971], предполагается, что продукты некроза или реакций, предшествующих некрозу, движутся от клеток, которые некротизируются, к соседним клеткам и вызывают механизм сопротивления. Высокая активность пероксидазы вызывает (опосредованно) некроз, который ведет к быстрой индукции устойчивости и, следовательно, к раннему ограничению размера некроза. Модифицированная гипотеза Симонса и Росса предполагает главную роль пероксидазы не в определении скорости роста некроза, а в образовании продукта как «индуцирующего агента», который после движения к соседним клеткам вызывает к действию механизм устойчивости [Weststeijn, 1976, 1978].

Есть предположение, что предпосылкой для индукции механизма локализации и образования некроза является разрыв мембран, который способствует контакту между пероксидазой и ее субстратами [Weststeijn, 1984]. Если разрыв мембран определяет повышение активности пероксидазы в месте образования некроза, то тогда что стимулирует увеличение активности фермента при системной устойчивости в верхних, незараженных листьях? Очевидно, в этих двух примерах имеет место повышение активности различных изопероксидаз. В принекротной зоне активируются одни пероксидазы, а на расстоянии, в листьях с системной устойчивостью, наибольшую активность проявляют совершенно другие молекулярные формы.

Белл [Bell, 1981] считает, что возрастание активности пероксидазы в клеточной стенке предшествует некрозу и существует прямая связь между процессом образования некрозов и активностью связанных со стенкой изоэнзимов. В этом отношении интересны данные по размножению вируса в протопластах. В протопластах, выделенных как из устойчивых, так и из неустойчивых растений табака, размножение ВТМ идет одинаково [Журавлёв, 1979]. Что же происходит с клеткой устойчивого хозяина, когда ее лишают оболочки и она превращается в протопласт? Чтобы получить протопласты, надо «растворить» с помощью специальных ферментов клеточную оболочку. В таком случае есть все основания предполагать, что соединения, удаляемые с оболочкой, ответственны за включение реакций, обеспечивающих локализацию вируса. При этом в качестве индуктора могут выступать соединения, которые в обычных условиях метаболизма выполняют совершенно другую функцию.

Если провести аналогию между вирусным и грибным заболеванием, то в случае с грибами такие индукторы-элизитеры уже найдены и определена их природа [Элберсгейм, Дарвилл, 1985]. Для вирусного поражения пока элизитер неизвестен. Однако можно считать, что в проявлении вирусиндуцированной устойчивости, а также между наличием или отсутствием клеточной стенки существует определенная взаимосвязь. Протопласты лишены клеточной оболочки и каких-то соединений, которые могут выполнять роль элизитера, включающего первый шаг цепи мета-

болических процессов, ограничивающих размножение и распространение вирусных частиц. Получение протопластов приводит и к тому, что вместе с клеточной стенкой удаляются ионо- и ковалентносвязанные изо-пероксидазы, которые занимают важное место в метаболизме растительных тканей.

Фостер в 1980 г. показал, что если растения табака сорта Ксантинк более чем за один день до появления некрозов перенести в условия с повышенной температурой, то в этих условиях некрозы не развиваются. Однако если растения из одних условий перенести в другие только за один день до появления пятен, то некрозы развиваются, но будут мельче, чем в контроле, и их дальнейший рост останавливается (Foster, 1973 цит. по: [Harrison, 1982]). Следовательно, пока некрозы не сформированы, индуцируется повышение активности пероксидазы, идет аккумуляция и окисление фенолов в местах заражения. После перенесения растений в условия с повышенной температурой резко возрастает каталитическая деятельность фермента пероксидазы, происходит интенсивное превращение фенолов в хиноны и идет быстрее процесс локализации вируса. Достоверное увеличение активности пероксидазы регистрируется через 24 ч после инфицирования сверхчувствительных растений. Итак, вначале действует индуктор, затем активизируется деятельность ферментных белков, среди которых одно из основных мест занимает пероксидаза. При изменении температуры меняются скорость локализации вируса и проявление индуцирующего фактора, определяющего последующий ход метаболических процессов.

Исследованиями, проведенными Вестштейн [Weststeijn, 1984], показано, что некрозобразующий фактор синтезируется только в растениях, выращенных при температуре 22°. Если же инфицированные ВТМ растения перенести в условия с температурой 32°, то некрозиндуцирующий фактор исчезает. Экстракты, полученные из растений, выращенных при температуре 22°, были токсичны для протопластов, в то время как экстракты из растений, выращенных при температуре 32°, не оказывали токсического действия на них. Образование токсического фактора предшествует развитию видимых некрозов, и у таких растений увеличивается проницаемость мембран. В вирусинфицированном системном хозяине или в сверхчувствительных растениях табака, выращенных при температуре 32°, проницаемость мембран не меняется. Автор предполагает, что в обычных условиях выращивания у сверхчувствительных растений табака происходит повреждение мембран, это обеспечивает взаимодействие между различными компартментами клеток виروزных растений и приводит к образованию некрозиндуцирующего фактора. При температуре 32° такого повреждения мембран не наблюдается.

Интересные данные о влиянии температурного фактора на проявление устойчивости приводит Я. Вандерпланк [1981]. Автором испытывались различные сочетания вирус—хозяин (ВТМ + табак, томаты; вирус желтой мозаики фасоли + горох; вирус огуречной мозаики + шпинат), и оказалось, что гетерозиготные растения по большей части устойчивы при температуре 18° и восприимчивы при 27°. Для некоторых растений температурный предел устойчивости выше и составляет 32°. Он объясняет этот предел особенностью физико-химических свойств белковых молекул,

обеспечивающих этот эффект. Если в зависимости от температуры изменяется доминирование, то изменение должно происходить в направлении от доминантной устойчивости при более низких температурах к рецессивной при более высоких. Возникает вопрос: как влияет температура на образование и выход индуктора, который играет регуляторную роль и запускает механизм устойчивости? Так это или иначе, покажут дальнейшие исследования, и вполне возможно, что главный индуктор, вызывающий повышение активности ферментов и запускающий механизм устойчивости на расстоянии, действует в течение очень короткого периода времени и поэтому неизвестен до сих пор.

7.1. ЭЛИСИТЕРЫ, ВКЛЮЧАЮЩИЕ МЕХАНИЗМ УСТОЙЧИВОСТИ

Становится совершенно очевидным, что существуют молекулы-посредники, которые должны включать начальный путь метаболических реакций защитных процессов, которые незамедлительно начинают действовать, как только хозяин «встречается» с патогеном. Такие молекулы или группы молекул получили название элиситеров. В качестве последних могут выступать фитогормоны и другие соединения как биотической, так и абиотической природы. Деятельность гормонов тесно взаимосвязана между собой, так, например, ауксин может стимулировать образование другого гормона — этилена и т. д. Для гормонов животных уже давно показана свойственная им иерархия последовательности включения определенных реакций метаболизма.

Среди соединений гормонального действия были открыты вещества различного строения и разных свойств. Элберсгейм и Дарвилл [1985] установили, что фрагменты клеточной стенки — олигосахариды, высвобождаемая из нее под действием специфических ферментов, являются более целенаправленными медиаторами, чем фитогормоны. Необычная сложность компонентов клеточной стенки растений навела авторов на мысль, что они могут выполнять не только структурные функции. Клеточная стенка ведет себя, как «железа», служащая хранилищем определенного класса регуляторных молекул, которые выделяясь из нее, способны контролировать целый ряд функций растения. Первичные стенки клеток растений на 90% состоят из полисахаридов, а остальные 10% приходится на долю белков. Больше всего в клеточной стенке содержится D-глюкозы, которая вообще представляет собой самый распространенный в природе сахар. Матрикс первичной клеточной стенки, как правило, включает не менее восьми различных полисахаридов, шесть из которых были идентифицированы.

Анализируя полисахариды гриба, авторам удалось выделить фрагмент, способный стимулировать синтез антибиотиков (фитоалексинов) в растении. Он представляет собой гепта- β -глюкозид, т. е. олигосахарид, состоящий из семи мономеров — молекул глюкозы, связанных между собой β -гликозидными мостиками. Авторами показано, что реакция растения на патоген строго специфична: оно «узнает» олигосахарид совершенно определенной структуры. Присутствие одной миллиардной грамма активной формы гептаглюкозида достаточно для индукции синтеза молекул

РНК на матрице ДНК генов, кодирующих соответствующие ферменты, необходимые для начала продуцирования антибиотика. Вновь синтезированный антибиотик останавливает рост гриба, в состав клеточной стенки которого входит указанный гептаглюкозид.

Выяснено также, что при повреждении растительных клеток они сами могут начать продуцировать фермент, который высвобождает из стенок соседних клеток олигосахариды, а они, в свою очередь, стимулируют в тканях растений синтез антибиотиков. Причем для этого вовсе не обязательно присутствие какого-либо специального фермента микроорганизма. Выяснено, что фермент, высвобождающий активный гептаглюкозид из стенки грибковой клетки, принадлежал растению-хозяину. Но так бывает не всегда. В других случаях такой фермент секретировался самим болезнетворным агентом — грибом или бактерией, а затем выщеплял из клеточной стенки растения олигосахарид — олигогалактуронид, который оказывал действие на соседние клетки.

Кроме того, если растительная клетка повреждена, она способна секретировать фермент, высвобождающий олигосахарид из стенок других клеток и запускать механизм репарации или устойчивости. Данные, приведенные авторами, очень наглядно раскрывают особенности взаимодействия хозяина и патогена на молекулярном уровне. Следовательно, стенки клеток растений представляют собой хранилища множества специфических соединений, в том числе олигосахаридов, активно участвующих в индукции биохимических реакций. Эти вещества — один из уровней в иерархии гормональной системы — не только отвечают за активацию защитных механизмов, но и влияют на многие процессы онтогенеза.

Применяя современные методы, многие исследователи проводят выделение и испытание различных элизитеров [Osman, Morgean, 1985; Hofori, Ohta, 1985; Modderman et al., 1985; Kus, Ruih, 1985]. Л. В. Метлицкий и О. Л. Озерецковская [1985] пишут, что роль элизитеров могут выполнять как компоненты клеточных стенок, так и экстрацеллюлярные ферменты, способствующие резкой интенсивности процессов биосинтеза фитоалексинов и некротизации клеток, т. е. реакции сверхчувствительности. Они отмечают, что быстрое отмирание клеток необходимо растению не только для задержки распространения патогена, но и для передачи здоровым клеткам «сигнала» об активации синтеза защитных соединений. Изучение, выделение и использование биотических элизитеров весьма перспективное направление защиты растений, так как эти метаболиты эффективны и безопасны для окружающей среды, являясь индукторами защитных реакций только на ранней стадии патогенеза.

Интересные исследования были проведены при изучении условий синтеза индукторов в дисках клубней картофеля, обрабатываемых экстрактами из культуральных фильтратов различных грибов [Keenan et al., 1985]. В качестве элизитеров были зафиксированы соединения с молекулярной массой, не превышающей 10 кДа, содержащие в своем составе белок и карбогидраты. Опыты, проведенные авторами, свидетельствуют, что белковая половина индуктора не является определяющей, так как более важна для проявления элизитерной активности карбогидратная часть молекулы. Культуральный фильтрат из расы 4

Phytophthora infestans содержал высокомолекулярный элисер, который вызывал покоричневение дисков клубней картофеля и индуцировал накопление фитоалексинов в них, которое тесно связано с полной остановкой распространения грибного заболевания [Daly, Knoche, 1976].

При вирусном поражении также происходит синтез фитоалексинов, но пока не ясно, принимают ли они участие в локализации вирусов, а если да, то каков механизм этого процесса [Bujarski, 1980]. Модерман с соавт. [Modderman et al., 1985] провели изучение карбогидратных фракций клеточных стенок растений табака сорта Ксанти нк, выясняя их элисерную активность в реакциях защиты против вируса табачной мозаики. Ими установлено, что карбогидратные соединения клеток здоровых растений обладают активностью, необходимой для включения реакции сверхчувствительности. Их действие проявляется в быстрой локализации вируса и уменьшении диаметра некрозов на 40—57%.

Роль элисеров могут выполнять и белковые фрагменты вирусных частиц, которые обнаруживаются в составе метаболитов растений-хозяев. Как пишет Гаррисон, если расщепление молекул вирусных РНК и посттрансляционное расщепление кодируемых вирусом полипептидов осуществляются ферментами, полностью или частично кодируемыми хозяином, то это представляет собой еще один способ, посредством которого растение может регулировать репродукцию вируса и, следовательно, защищать себя [Harrison, 1982]. Исходя из этого, можно предполагать, что медиаторами некротического процесса у сверхчувствительных хозяев могут являться первые фрагменты вирусных частиц. Больше того, растение-хозяин и само начинает синтезировать фрагменты, которые могут выполнять роль элисеров на случай повторного заражения хозяина.

Ю. Л. Дорохов [1985] считает причиной устойчивости растений к вирусу «блок транспорта» геномной РНК. В факультативно устойчивом хозяине при заражении ВТМ или ХВК индуцируется abortивная инфекция, характеризующаяся синтезом и транспортом коротких РНК при одновременном «блоке синтеза и транспорта» геномной РНК и зрелого вируса. Автор считает, что существует тесная взаимосвязь между транспортом инфекции и устойчивостью растений к вирусам. «Белковый фрагмент», описанный автором, также вполне может быть и элисером синтеза соединений типа фитоалексинов в растениях, пораженных вирусной инфекцией.

Изложенное выше свидетельствует о том, что природа элисера может быть различной. Так, для фитофтороза сои им являются β -1,3-1,6-глюкан с молекулярной массой 100 кДа и гликопротеин с массой 150 кДа. Выяснено, что биотические элисеры вызывают образование фитоалексинов в концентрации 10^{-9} — 10^{-13} М, а абиотические — только в концентрации 10^{-3} М. Причем биотические стимулируют образование только фитоалексинов, т. е. их действие целенаправлено, а абиотические элисеры могут стимулировать синтез и других соединений, совершенно не связанных с защитной функцией [Метлицкий, Озерецковская, 1985]. Абиотический элисер, нанесенный на поверхность растительной ткани, вызывает гибель поверхностных клеток, с которыми он непосредственно соприкасается, в то же время фитоалексины образуются в более глубоко расположенных слоях клеток, куда такой элисер вряд

ли проникает. Между поверхностным элиситером и фитоалексинами может существовать еще один индуктор синтеза фитоалексинов. Об эстафете индуцирования последовательных защитных реакций достаточно полно изложено у Л. В. Метлицкого и О. Л. Озерецковской [1985].

Необходимость участия фрагментов клеточных стенок в индукции сверхчувствительности к вирусному заболеванию подтверждается тем, что размножение ВТМ в протопластах, выделенных из листьев некротических сортов растений табака, не приводит к образованию некрозов [Журавлев, 1979]. Следовательно, с удалением наружных клеточных оболочек нарушается способность образования каких-то соединений и возможность индуцировать защитные реакции.

Открытым остается вопрос о возможном участии в защитном механизме рецепторных мест клеточной мембраны у сверхчувствительных растений, инфицированных вирусами, как об этом писал еще в 1972 г. Лоебенштейн [Loebenstein, 1972]. Очевидно, элиситер-индикатор синтезируется на поверхности мемbrane, а вирус может привносить определенную «информацию» о контакте, индуцируя цепь ответных реакций растения-хозяина. Первоначальное нарушение барьерной функции плазматической мембраны и приведет к последующему сдвигу равновесия внутри пораженной клетки за счет изменения ионного состава среды, уровня активности многих ферментных систем, и в первую очередь окислительно-восстановительных, принимающих самое активное участие в процессах адаптации.

7.2. ПРЕТЕНДЕНТ НА РОЛЬ ЭЛИСИТЕРА-ИНДУКТОРА

Понимание последовательности реакций проявления сверхчувствительности влечет за собой необходимость выяснения самых первых изменений метаболизма, природу индуктора, который принимает непосредственное участие в запуске защитных процессов. Важное место при взаимодействии вирусов и клеток хозяина должны играть ферментные белки и фитогормоны. Образование последних регулируется клеточной мембраной. При нарушении целостности мембран наибольший интерес представляют те изменения, которые ведут к образованию этилена. Мембраны, и в первую очередь плазматические мембраны, играют важную роль в регуляции синтеза этого гормона [Imaseki et al., 1975; Odawara et al., 1977; Venis, 1984].

Сравнительно давно замечено, что хлороз и некроз клеток растений, инфицированных вирусами, сопровождаются резким повышением синтеза этилена. Многие исследователи отводят основную роль этилену как индуктору защитного механизма [Nakagaki et al., 1970, 1981; Pritchard, Ross, 1975; Paradies, Elstner, 1980; Laats, Loon, 1983 a, b, и др.]. Синтез этилена тесно связан с метаболизмом соединений клеточной стенки, и именно при его участии активизируется деятельность ковалентносвязанных с ней изопероксидаз [Ringe, Osborne, 1970, 1971]. Растения с некротическим типом реакции на вирусное поражение (Ксанти нк, Самсун NN + ВТМ) при температуре 28—32° становятся системными по отношению к этому вирусу и при такой же температуре резко снижается синтез этилена [Дженсен, 1968]. Если этилен выступает как индикатор

образования некрозов, то исчезновение сверхчувствительности и снижение синтеза этилена при повышении температуры взаимосвязаны.

Увеличение образования этилена в течение развития сверхчувствительной реакции зависит в основном от повышения содержания в тканях его предшественника — 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК). Заражение растений не приводит к накоплению АЦК, так как кислота немедленно превращается в этилен. Образование его начинается через 2 ч после перенесения инфицированных ВТМ растений Самсун NN из помещения с температурой 30° в помещение с температурой 20° и за 6 ч до развития некрозов [Laat, Loon, 1983a]. Авторы считают, что сама по себе некротическая реакция не является причиной для увеличения образования этилена, но тем не менее показано, что существует обратная зависимость между количеством образующегося этилена и размером некроза [Laat, Loon, 1983b].

Поскольку при перенесении растений в условия с повышенной температурой снижается образование этилена, а также прекращается развитие некрозов, при повышении температуры отключается механизм, отвечающий за синтез этилена и активирование многих последующих реакций метаболизма. Японские исследователи убедительно доказали зависимость синтеза этилена от повышенных температур [Horiuchi, Imaseki, 1986]. При повышении температуры угнетается ИУК-индуцируемое [Riov et al., 1982] и АЦК-зависимое образование этого гормона. Синтез этилена может подавляться и белками, связанными с мембранами клеточных стенок [Odawara et al., 1977], что свидетельствует о регуляции его синтеза при участии этих белков. Важность поверхностной мембраны в регуляции очевидна, так как клетки, лишенные оболочек, не образуют гормон.

Ферменты, отвечающие за образование этилена, изучены недостаточно. Однако было выяснено, что стимуляция синтеза этилена происходит при активном действии β -1,3-глюкангидролазы [Abeles, Florgence, 1970]. Так, в растениях *N. glutinosa*, зараженных вирусом, в местах формирования некрозов активность β -1,3-глюкангидролазы значительно повышается [Moore, Stone, 1972]. Это подчеркивает, что путь синтеза этого гормона сложен. Следует учитывать и то, что предшественником этилена может быть и 2-хлорэтилфосфоновая кислота, которая способствует уменьшению диаметра некрозов в системе Самсун NN + ВТМ [Loon, 1977]. Образование этилена в растениях также идет и из S-аденозилметионина (SAM), который является в то же время донором CH_3 -групп в разных реакциях метилирования [Yang, Hoffman, 1984]. Б. Ф. Ванюшин [1985] предполагает, что этилен по принципу обратной связи контролирует образование SAM и тем самым существенно влияет на процессы метилирования биополимеров, в частности ДНК. Усиленное образование этилена при реакции сверхчувствительности должно сопровождаться дефицитом SAM и, очевидно, задержкой метилирования.

Основная роль большинства фитогормонов в растительной клетке заключается в контроле экспрессии генов [Кулаева, 1978]. Для реализации этой функции гормон должен связаться с белком-рецептором и в виде гормонорецепторных комплексов транслироваться в ядро. В ядре эти

комплексы присоединяются к хроматину, что приводит к его активации и индукции транскрипции с образованием соответствующих иРНК. Полная или частичная экспрессия генов в первично зараженных клетках устойчивых растений-хозяев определяет возникновение вирусиндуцированной устойчивости — этого естественного щита на пути размножения вирусной инфекции. Многие этапы этого сложного процесса активации генов с участием фитогормонов изучены слабо [Ванюшин, 1985]. Выяснение роли этилена при вирусном патогенезе усложняется еще и тем, что он имеет несколько предшественников синтеза.

Радиоактивный ^{14}C -этилен включается в бензольное кольцо, а затем метка обнаруживается в продуктах превращения, и в том числе в бензойной кислоте [Jansen, 1964]. Бензойная кислота — предшественник ароматических карбоновых кислот, таких, как коричная, кофейная, *n*-оксибензойная и др. Грибные и вирусные инфекции стимулируют синтез этилена, последний способствует активированию фермента пероксидазы и накоплению ароматических соединений. Как сама бензойная, так и *n*-бензойная кислота и ее эфиры обладают сильным бактерицидным действием [Карпер, 1962; Brown, Swinburne, 1971]. Следовательно, не исключается определенный путь метаболизма от этилена до фенольных соединений.

Проведенное нами изучение фенольных соединений показало высокое содержание *n*-оксибензойной кислоты в листьях растений табака сорта Ксаити нк, зараженных ВТМ. Так, бензойной кислоты было в 4 раза больше в листьях нижнего яруса инфицированных растений по отношению к контролю. В 2—3 раза выше содержание этой кислоты и в молодых листьях, обладающих системной вирусиндуцированной устойчивостью (см. 4.5). Этот факт представляется очень интересным, так как синтез бензойной кислоты индуцирован вирусным поражением, а она может выступать как антивирусный фактор.

Таким образом, нарушение целостности поверхностной мембраны при заражении ведет к последующему синтезу этилена. В виде гормоно-рецепторного комплекса этилен, очевидно, оказывает влияние на геном растения, активизируя защитные реакции как в местах образования некрозов, так и на расстоянии, выполняя роль активного индуктора этих процессов.

7.3. ВОЗМОЖНОЕ УЧАСТИЕ ПЕРОКИДАЗЫ В ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЯХ РАСТЕНИЙ

В недавно вышедшей работе Гаспара и др. [Gaspar et al., 1985] приведена интересная и весьма оригинальная схема участия фермента пероксидазы в различных метаболических процессах. Эта схема дает наиболее полное представление об участии кислых и основных изопероксидаз в ответных реакциях на стрессовое состояние растительного организма. Авторы обобщили свои и литературные данные многих исследователей и сделали вывод о двух ступенях взаимозависимого контроля щелочными и кислыми пероксидазами при ответе растений на различные физико-химические и биологические воздействия. При этом любой стресс индуцирует деполяризацию клеточной мембраны, в результате чего изме-

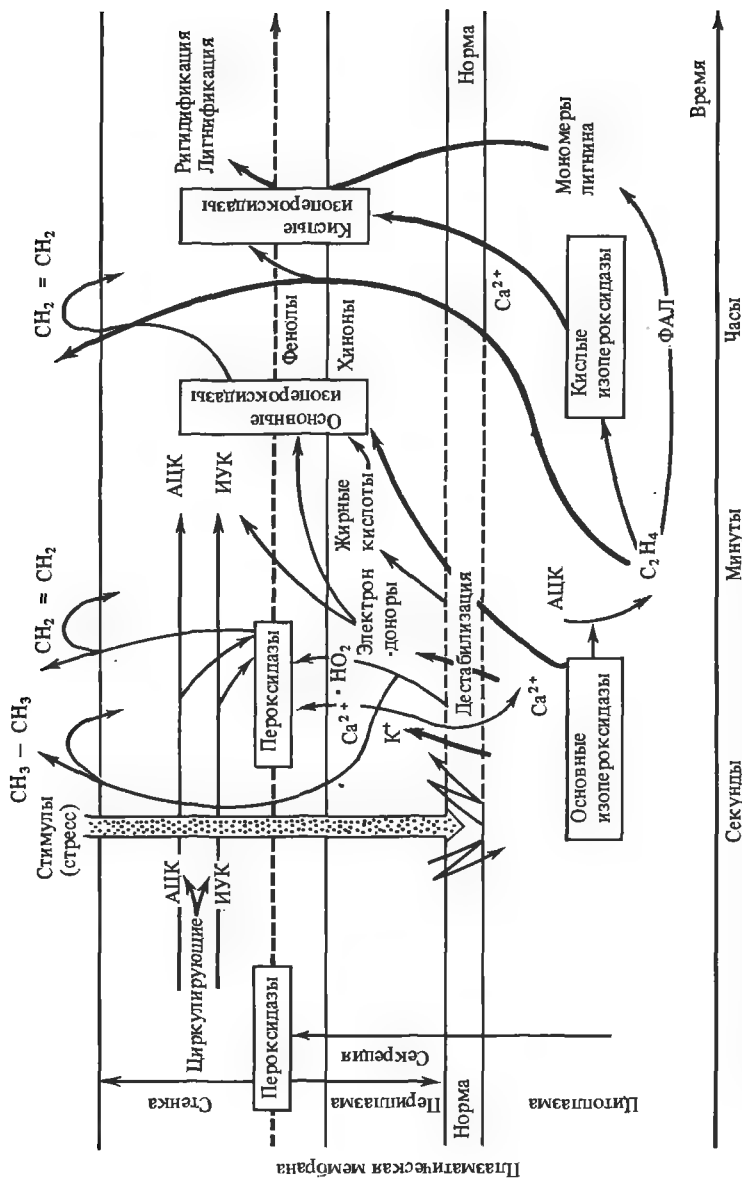
няется соотношение Са/К, а это ведет к вытеканию из клетки растворимых веществ, среди которых могут быть доноры электронов, такие как аскорбиновая кислота и соединения фенольной природы.

Увеличение внутриклеточного уровня Са может приводить к активированию секреции основных пероксидаз в свободное пространство, где они, взаимодействуя с донорами электронов и, возможно, с циркулирующей ИУК, утилизируют перекиси; ослабление связи основных пероксидаз с мембранными структурами позволяет им действовать как 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота (АЦК)-оксидаза. В результате ИУК и АЦК-оксидаза вызывают изменение в преобразовании этилена, который далее индуцирует (через механизм запуска синтеза белков) увеличение активности фенилаланин-аммиак-лиазы и кислых пероксидаз. На основании отдельных результатов исследований и интерпретации модельных состояний возможного течения биохимических реакций были получены доказательства существования двух различных механизмов контроля метаболизма основными и кислыми пероксидазами, опосредованных этиленом. Эти два механизма, контролируемые разными пероксидазами, могут быть главными в тех реакциях, которые активизируются в ответ на различные внешние воздействия (стресс) (рис. 22). Авторы подчеркивают регуляторную роль деятельности фермента пероксидазы и фенольных соединений.

Значительное увеличение активности основных пероксидаз в свободном пространстве наблюдали после применения различных обработок, что указывает на стимулирующий контроль за активностью клеточной секреции, которая показана для суспензии культуры клеток [Penel et al., 1984]. При этом ион Ca^{2+} способствует связыванию основных пероксидаз с мембранами, и он также необходим для коррекции конформационного состояния апофермента молекулы пероксидазы. В противоположность основным пероксидазам кислые изоэнзимы этого фермента очень быстро включают меченые аминокислоты, а это говорит о высокой скорости оборота и обновления этих пероксидаз и о том, что увеличение активности кислых пероксидаз может быть обусловлено их синтезом (Castillo, 1984, цит. по: [Gaspar et al., 1985]).

Разные типы воздействий генерируют различные виды свободных радикалов, например пероксидные радикалы, которые участвуют в перекисном окислении липидов. Маркером этого процесса является этан, участвующий в перераспределении электрохимического потенциала электронов на мембране. Разрушение липопротеинов клеточных мембран при перекисном окислении липидов изменяет статус ионов и их вытекание на уровне плазмалеммы, что позволяет выходить из клетки и таким соединениям, как фенолы и аскорбиновая кислота, большинство из которых доноры электронов. При этом жирные кислоты могут способствовать активированию пероксидазы и ее конформационным изменениям. Используя свободные пероксидные радикалы, основные пероксидазы разрушают доноры электронов и действуют как агенты детоксикации перекисей в коротких реакциях метаболизма, выполняя активную защитную функцию.

Гаспар и соавт. приводят данные о коррелятивной связи между активностью мембранно-связанной пероксидазы и образованием этилена



Р и с. 22. Предполагаемый общий путь реакций в некоторых клеточных компартаментах в ответ на различные физиологические и химические стимулы
 Подробные объяснения см. в тексте [Gaspar et al., 1982]

[Gaspar et al., 1985]. Авторы пишут о реакциях превращения АЦК в этилен *in vitro* при использовании мембран, в которые встроены пероксидазы. Как АЦК-оксидазы мембранно-связанные пероксидазы регулируют продукцию этилена. Лимитирующим фактором при этом является наличие пула АЦК, хотя на образование АЦК могут также стимулирующе действовать ионы Ca^{2+} [Evensen, 1984]. Главная роль этилена — регулировать деятельность кислых пероксидаз и фенилаланин-аммиак-лиазы. Следовательно, при посредстве этилена регулируется не только деятельность пероксидаз, но и синтез фенольных соединений.

Авторы приведенной схемы (см. рис. 22) считают, что в самом начале процесса, очень быстро реагируя на любой стресс, активируются основные пероксидазы как первый шаг ответа, а изменения, связанные с метаболизмом ауксина и этилена, индуцируют усиление синтеза кислых пероксидаз как второй, и более поздний, шаг ответа или защиты. Предполагаемая последовательность реакций, составленная по имеющимся данным, показывает, что только два гормона тесно связаны через посредство пероксидазы с процессами ответа на различные нарушения. Ауксин и этилен, как циркулирующие гормоны, регулируют метаболизм растения в целом. Ауксин, пероксидаза и этилен взаимосвязаны при лигнификации тканей и проявляют свое действие в местах образования локальных повреждений. Сигналом, транспортируемым на расстояние, может быть АЦК, присутствие которой в различных частях растения является лимитирующим и определяющим фактором. АЦК-зависимый синтез этилена выражается как градиент реакций по всему растению. Такой тип сигнальных реакций обуславливает повышение активности пероксидазы на значительном расстоянии от клеток, пораженных вирусом, обеспечивая проявление вирусиндуцированной системной устойчивости.

При изучении грибных заболеваний было выяснено, что передача сигнала внутрь клетки идет от ее поверхности, которая соприкасается с патогеном. Белки, узнающие патоген, передают сигнал и мобилизуют клетки на борьбу с ним. Для координации реакций существует механизм, посредством которого зараженные клетки передают информацию не только в клетки, расположенные рядом, но и в удаленные на значительные расстояния. В таких реакциях организма роль фитогормона может быть определяющей.

В последнее время появляются сведения о том, что фактор, индуцирующий защитные процессы, может передаваться потомству [Roberts, 1983; Wieringa-Brants, Dekker, 1987]. Так, Робертс [Roberts, 1983] показал, что приобретенная устойчивость передается через семена. Этот феномен был установлен, когда нижние листья растений сверхчувствительного табака сорта Самсун NN неоднократно в течение двух недель инокулировали вирусом табачной мозаики. Устойчивость, проявляющаяся в таких растениях, выражалась в том, что диаметр некрозов на листьях, обладающих системной устойчивостью, после предварительного многократного заражения уменьшался на 50% по сравнению с контрольными растениями.

Потомство, выращенное из семян этих растений, также обладало устойчивостью к заражению ВТМ. У таких растений после заражения их вирусом диаметр некрозов был на 28—38% меньше, чем в контроле,

что свидетельствует о сохранении в потомстве свойств, характерных для устойчивых тканей растений-родителей. Какой-то антивирусный агент, синтезируемый в процессе заражения растений вирусом, может передаваться потомству не генетическим путем, так как многократное инфицирование растений-родителей приводит к выработке соединений, «помнящих» о предварительном заражении. Это подтверждает предположение, что в организме растений могут существовать «антителоподобные» белки, индукторы синтеза которых передаются потомству. Сам факт передачи устойчивости через семена является весьма обнадеживающим и дает возможность поиска путей расшифровки сущности механизма приобретенной устойчивости.

Как показывают многочисленные исследования, пероксидаза может оказывать непосредственное действие на частицы различных патогенов. Наиболее четкое действие пероксидазы хрена определено для бактерий и грибов. Бактерицидное действие этого фермента усиливается в присутствии его субстратов — соединений фенольной природы, так как вирусные РНК и большинство растительных вирусов инактивируются *in vitro* энзиматически окисленными фенолами [Mink, Saksena, 1971; Saksena, Mink, 1970; Woods, Agrios, 1974]. Установлено бактерицидное действие пероксидаз хрена и сои в присутствии перекиси водорода и йодида калия [Urs, Dunleavy, 1975]. Авторы установили, что йодид калия обязателен, если использовать подходящий субстрат, например катехол. При наличии перекиси фермент окисляет катехол до *o*-бензохинона [Saksena, Mink, 1970], который и инактивирует растительные вирусы.

Чтобы проверить действие окисленных фенолов непосредственно на патоген, Урз и Данлейви [Urs, Dunleavy, 1974, 1975] поставили ряд опытов. Они провели окисление катехола перед добавлением бактерий и наблюдали, что бактерицидное действие такой системы значительно усиливалось. Хорошие результаты были получены также, когда в исследуемую смесь добавляли окисленный гидрохинон или гваякол. Действие пероксидазы было испытано и при окислении скополетина. Последнего в концентрации от 10^{-5} до 10^{-6} М было достаточно для проявления антипатогенного действия испытываемой системы. Авторы считают, что пероксидаза— H_2O_2 —фенол может прямо включаться в механизм устойчивости растений при инактивации бактерий *Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis*.

Таким образом, накопленный фактический материал свидетельствует о том, что бактерицидный эффект пероксидазы усиливается при участии фенолов, окисляемых до хинонов, и что эти процессы тесно взаимосвязаны. При перекисном окислении многие соединения превращаются в реакционноспособные радикалы. Последние ковалентно связываются с различными молекулами, образуя естественные конъюгированные антигены, которые в результате последующих окислительно-восстановительных реакций обезвреживаются.

И. Е. Ковалев и О. Ю. Полевая [1985] на большом материале показали, что белковые молекулы, обладая реакционноспособными группами, связываются с различными антигенами, в качестве которых могут быть белки, нуклеиновые кислоты, их фрагменты и различные низкомолекулярные соединения, в том числе фенолы. Последние, превращаясь в хиноны, ковалентно связываются с другими белками за счет активированной двой-

ной связи. Участие пероксидазы в этих процессах приводит к биоактивации различных соединений. В связи с этим следует иметь в виду, что в растениях сверхчувствительных хозяев, хотя вирус и локализован в местах образования некрозов, в целом растении присутствуют фрагменты вирусных частиц [Дорохов, 1985; Atabecov, Dorokhov, 1984]. Поэтому в целях защиты от этих эндогенных антигенов должна существовать защитная система, освобождающая организм от таких соединений. Пероксидаза имеет три карбоксильные группы на поверхности белка, которые принимают непосредственное участие в окислении субстратов [Ugarova et al., 1984]. Очевидно, именно боковые цепи реакционноспособных групп пероксидазы, захватывая антигены, осуществляют их удерживание и обезвреживание в присутствии перекиси водорода и фенолов с последующей их утилизацией в процессах метаболизма. Такой тип детоксикации антигенов в животных тканях широко распространен. К тому же для получения конъюгированных антигенов часто используют пероксидазу растений хрена ([Ковалев, Полевая, 1985], см. также 3.1), что также подтверждает наличие в молекуле пероксидазы реакционноспособных групп.

Таким образом, вопрос о том, участвует ли пероксидаза в защитном механизме растений, убедительно склоняется в положительную сторону. Однако в деле изучения иммунных реакций растительных организмов необходим более широкий системный подход. Пероксидаза — эволюционно старый белок, возникший гораздо раньше других гемсодержащих соединений. Это и весьма реакционноспособный фермент, с помощью перекиси водорода и различных кофакторов осуществляющий окислительно-восстановительные процессы, в результате которых идет превращение и утилизация самых различных соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Начальный процесс патогенеза можно разделить на две фазы — детерминантную и экспрессивную [Метлицкий, Озерецковская, 1985]. Первая определяет, вторая выполняет, т. е. происходит определение специфики контакта и задается программа для ее выполнения. В последней фазе растение уже «знает», как защитить себя от патогена. Именно экспрессивную фазу изучают многие исследователи у растений-хозяев, сверхчувствительных к вирусному поражению. Эта фаза характерна прежде всего тем, что в клетках устойчивых растений в месте инициации некрозов резко изменяется метаболизм, и это выражается в активации многих ферментов, изменяется синтез их субстратов, аккумулируются фенолы и хиноны. Особенности проявления метаболических процессов в этой фазе изучаются давно и очень интенсивно, накоплено большое количество данных. Гораздо хуже обстоит дело с первой — детерминантной фазой, когда взаимодействие вируса и клеток растения-хозяина в первые секунды трудно оценить достоверно. А именно контакт клеток хозяина и вируса определяет дальнейшую судьбу встречи. Вопрос состоит в том, как осуществляется этот контакт на молекулярном уровне. Что определяет специфику взаимодействия и есть ли эта специфика?

Растение должно иметь рецепторные молекулы на поверхности клеточ-

ных мембран, чтобы идентифицировать любую встречу с тем, что ему чуждо и помешает нормальному течению метаболических процессов. В настоящее время сведения об этой первой фазе взаимодействия вируса и хозяина только начинают появляться. Пока ни для одного из многочисленных случаев взаимодействия вируса и растения-хозяина мы не можем сказать со всей определенностью, какое соединение является: а) рецептором, б) элитером, «провоцирующим» ответ растения. Не ясно при поражении, одна ли цепь метаболических реакций определяет проявление защитного механизма, или таких «цепей» может быть несколько и в зависимости от специфики контакта проявляется тот или другой путь необходимых реакций. Еще предстоит выяснить, один ли механизм обеспечивает ограничение вирусной инфекции в местах образования некрозов и при возникновении приобретенной системной устойчивости. Вполне возможна и своя особенность в проявлении этих двух биохимических процессов.

Интерес к проблеме вирусиндуцированной устойчивости не ослабевает с годами, и это вполне понятно, поскольку такая природная устойчивость запрограммирована самим организмом и проявляется в подавлении развития инфекционного процесса. Для различных растений-хозяев, пораженных вирусами, характерно увеличение активности фермента пероксидазы. Сравнительно давно дискутируется вопрос о роли этого фермента в иммунитете растений. Ряд исследователей и автор настоящей работы отстаивают точку зрения на активное участие фермента в защитном механизме растительных организмов. Растения могут реагировать на патоген, высвобождая пероксидазу из связанного состояния или изменяя активность фермента в результате модификации молекулы под влиянием вируса. Но фермент — это только один элемент из пероксидазной системы, и активность проявляется лишь тогда, когда есть перекись водорода и фенолы или доступный галоген. Эти два факта могут объяснить, почему устойчивость и увеличение активности пероксидазы не всегда коррелируют.

Достаточно убедительны данные о бактерицидном и фунгицидном свойстве этого фермента. По всей вероятности, фермент пероксидазы участвует в плейотропном ответе в иерархии последовательных и (возможно) непоследовательных биохимических реакций, выступая как фермент, регулирующий многие процессы. По-видимому, есть основания считать пероксидазу «антителоподобным» белком, так как она реагирует на многие изменения, происходящие как внутри организма, так и в окружающей среде.

Выделенные нами и охарактеризованные по некоторым параметрам анионные пероксидазы вирусных растений, очевидно, занимают ключевое положение, так как их активность у инфицированных растений в течение длительного времени остается много выше контрольной. Это свидетельствует о том, что они выполняют важную роль, окисляя определенные субстраты, накапливающиеся в инфицированном организме. Высокое сродство к субстратам фенольной природы, у анионных изоэнзимов пероксидазы инфицированных растений по отношению к контролю вполне может служить маркерным признаком при выведении сортов растений, устойчивых к вирусным заболеваниям.

Фациоли [Faccioli, 1979] считает, что приобретенная устойчивость не может быть результатом только одного механизма или метаболита. Такой же мысли придерживаются Ю. А. Урманцев и Н. Д. Пронина [1986], которые пишут, что «единой устойчивости нет, а есть устойчивость единого одного и того же растения с одним и тем же генотипом, реализующего различные генетические подпрограммы и тем самым различные физиолого-биохимические и молекулярно-биологические механизмы устойчивости в ответ на действие различных стрессов».

Проведенные в последнее время исследования выявили тесную связь между неспецифическими и специфическими факторами защиты и механизмами их регуляции. Для животных объектов это наглядно демонстрирует пример интерферона — универсального естественного ингибитора, подавляющего вирусную репродукцию на самом раннем ее этапе, когда иммунологическая защита еще полностью отсутствует. Показано, что растительные организмы в ответ на заражение также синтезируют интерфероподобные белки, жизнь которых несколько продолжительнее, чем интерферона животных.

Для фитоиммунологов в настоящее время очень важно формирование представлений о сущности различий механизмов, с помощью которых растения защищаются и обеспечивают себе выживаемость при стрессовой ситуации. Весьма важно знать элиситеры, образующиеся в клетках вирозных растений, направляющие ответные реакции. Поиски этих соединений есть главная задача современных исследований фитовирусологов и биохимиков. Становится вполне очевидным, что элиситеры определяют начало встречи хозяина и патогена. От первоначального направления реакций зависит весь ход и последующее разнообразие, которое определяет пластичность живого организма. Ответные реакции растений значительно сложнее, чем это представлялось еще совсем недавно. Несмотря на большое количество данных, полученных за последние 10—20 лет, не удалось понять сущность экспрессии генов устойчивости на биохимическом уровне.

Очевидно, следует иметь в виду и неперспективность обычного пути раздельного изучения устойчивости в области формирования некрозов и специфического иммунитета, возникающего на значительном расстоянии от них. Как одно, так и другое проявление ответных реакций тесно взаимосвязаны между собой, хотя есть и должны быть определенные различия в выражении этих процессов. Молекулярно-биологический анализ защитных реакций также не может быть оторван от особенностей метаболизма растения в целом. Всестороннее изучение иммунных процессов, происходящих в устойчивых тканях растений-хозяев на молекулярном уровне, позволит не только расшифровать механизмы проявления естественно возникающей устойчивости, но и найти подходы к разработке действенных мер борьбы с инфекционными болезнями, наносящими значительный материальный ущерб сельскому хозяйству.

- Аверьянов А. А., Исмаилов А. И. Участие супероксидазного радикала в автоокислении госсипола // Биол. науки. 1986. № 5. С. 76—78.
- Аверьянов А. А., Лапикова В. П. Активированный кислород как возможный посредник в противоионфекционном действии растительных фенолов // Кислородные радикалы в химии и биологии: Материалы совещ. 22—25 февр. 1984 г. Минск: Наука и техника, 1984. С. 5—13.
- Аксенова В. А., Кожанова О. Н., Рубин Б. А. О некоторых свойствах пероксидазы инфицированных тканей растений // Физиология растений. 1971. Т. 18, вып. 2. С. 387—391.
- Аксенова В. А., Рубин Б. А., Савченко Р. В., Брызна А. И. Некоторые свойства митохондрий и рибосом инфицированных тканей растений // Биохимия. 1968. Т. 33, вып. 3. С. 527—536.
- Алексеева В. А., Рамазанова Л. Х. Активность и изоферментный состав пероксидазы листьев бобов в связи с обезвоживанием // ДАН СССР. 1973а. Т. 200, вып. 1. С. 235—238.
- Алексеева В. А., Рамазанова Л. Х. О каталитических функциях пероксидазы хлоропластов при обезвоживании // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1973б. № 6. С. 903—905.
- Алябьева Г. В., Омельченко С. И., Андреева В. А. Выделение анионных изопероксидаз из растений табака, зараженных вирусом табачной мозаики // Влияние вирусов на обмен растений. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1983. С. 10—16.
- Андреева В. А. Роль пероксидазы в защитном механизме растений, пораженных вирусами // Plant virology: Proc. of the 9th conf. of the Czechosl. plant virologists. Врно, 1981. р. 21—24.
- Андреева В. А., Воронова В. А. Индукция активности пероксидазы при вирусном и механическом повреждении // Вирусные болезни растений и меры борьбы с ними. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1980. С. 26—29.
- Андреева В. А., Воронова В. А. Влияние штаммов Х-вируса картофеля на кинетику фермента пероксидазы // Тр. ЛСХА. Елгава, 1981, вып. 191. С. 12—14.
- Андреева В. А., Воронова В. А., Угарова Н. К. Активность, изоферментный спектр, термостабильность и молекулярный вес пероксидазы, выделенной из здоровых и зараженных вирусами растений табака // Биохимия. 1979. Т. 44, вып. 3. С. 394—399.
- Андреева В. А., Омельченко С. И. Электрофоретический спектр белков растений *Datura stramonium* L., пораженных вирусом скручивания листьев картофеля // Вирусные болезни растений ДВ. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1976. Т. 25(128). С. 158—163.
- Андреева В. А., Омельченко С. И. Выделение и очистка пероксидазы из растений *Datura stramonium* L., пораженных Х-вирусом картофеля // Прикл. биохимия и микробиология. 1978. Т. 14, вып. 5. С. 747—751.
- Андреева В. А., Омельченко С. И. Некоторые физико-химические свойства изонзимов пероксидазы, выделенной из здоровых и инфицированных листьев растений *Datura stramonium* L. // Взаимодействие вирусов с клетками растений-хозяина. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1985. С. 34—39.
- Андреева В. А., Омельченко С. И. Активность анионных изопероксидаз при вирусиндуцированной устойчивости растений // Тез. докл. V Всесоюз. биохим. съезда. М: Наука, 1986. Т. 3. С. 190—191.
- Андреева В. А., Омельченко С. И., Паутова Л. А. Изонимный спектр пероксидазы в растениях, инфицированных вирусом // Вирусные болезни растений ДВ. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1973. Т. 14(117). С. 46—52.
- Андреева В. А., Романова С. И., Иванова Т. П. Активность окислительно-восстановительных ферментов листьев *Datura stramonium* L., пораженных разными штаммами ХВК // Штаммы вирусов растений. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1977. Т. 46(149). С. 137—140.
- Андреева И. В., Сидько Ф. Я., Шустерс Т. Я. Об использовании методов инфракрасной спектроскопии в биохимических исследованиях растений // Физиология растений. 1985. Т. 32, вып. 3. С. 615—620.

- Барабаш Р. Д., Гукевич Е. К., Березовская З. В. и др. Роль пероксидазы в патогенезе пародонтоза // *Вопр. мед. химии*. 1979. Т. 25, № 3. С. 333—342.
- Барабой В. А. Растительные фенолы и здоровье человека. М.: Наука, 1984. 160 с.
- Березин И. В., Угарова Н. Н., Кершенгольц Б. М. Определение константы равновесия между нативным ферментом и апо-ферментом для пероксидазы из хрена // *ДАН СССР*. 1974. Т. 214, № 3. С. 701—704.
- Березин И. В., Угарова Н. Н., Кершенгольц Б. М., Бровко Л. Ю. Влияние протестической группы пероксидазы из хрена на стабильность фермента // *Биохимия*. 1975а. Т. 40, вып. 2. С. 297—301.
- Березин И. В., Угарова Н. Н., Дмитриева-Гетлинг М. П., Кершенгольц Б. М. Кинетика и механизмы действия пероксидазы из хрена в реакции окисления диоксифумаровой кислоты кислородом воздуха // *Там же*. 1975б. Т. 40, вып. 3. С. 475—483.
- Биохимия иммунитета, покоя, старения растений / Под ред. И. В. Березина. М.: Наука, 1984. 264 с.
- Биохимия фенольных соединений / Под ред. Дж. Харборна. М.: Мир, 1968. 451 с.
- Богдан Г. П. Природа защитной реакции растений. Киев: Наук. думка, 1981. 208 с.
- Бояркин А. Н. Быстрый метод определения активности пероксидазы // *Биохимия*. 1951. Т. 16, вып. 4. С. 352—357.
- Бояркин А. Н. Быстрый метод определения активности полифенолоксидазы // *Там же*. 1954. Т. 4, вып. 6. С. 398—403.
- Брежнев Д. Д., Луковникова Г. А., Казакова А. А., Генейди Г. С. Легкорастворимые белки и изоферменты пероксидазы *Allium* сера L. в процессе его роста и развития в связи с явлением гетерозиса // *Физиология растений*. 1970. Т. 17, вып. 5. С. 1062—1068.
- Будилова Е. В., Рубин Б. А., Иванова М. А., Семенова М. А. Изоферменты пероксидазы в листьях кукушки (*Nuphar luteum*) // *ДАН СССР*. 1971. Т. 200, вып. 4. С. 980—982.
- Бузун Г. А. К определению молекулярного веса белков электрофорезом в полиакриламидном геле // *Прикл. биохимия и микробиология*. 1976. Т. 12, вып. 1. С. 118—122.
- Вандерпланк Я. Генетические и молекулярные основы патогенеза у растений. М.: Мир, 1981. 236 с.
- Ванюшин Б. Ф. Молекулярные механизмы действия фитогормонов // *С.-х. биология*. 1985. № 5. С. 110—112.
- Вечер А. С. Основы физической биохимии растений. Минск: Наука и техника. 1984. 263 с.
- Владимиров Ю. Н., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 205 с.
- Войлоков А. В. Генетический контроль изоферментов высших растений // *Успехи соврем. генетики*. 1978. Т. 4. С. 150—170.
- Войлоков А. В., Нарбут С. И. О разнообразии спектров анионных пероксидаз у межлинейных гибридов редиса // *Генетика*. 1974. Т. 10. № 5. С. 160—162.
- Воронков Л. А. О биологической роли и механизме действия пероксидазы // *С.-х. биология*. 1967. Т. 2, вып. 1. С. 78—84.
- Воронков Л. А., Живописцева И. В. Изучение каталитических свойств пероксидазы хлоропластов // *Физиология и биохимия здорового и больного растения*. М.: Изд-во МГУ, 1970. С. 305—311.
- Воронова В. А., Угарова Н. Н., Андреева В. А. Кинетические свойства пероксидазы, выделенной из здоровых и зараженных вирусами растений табака // *Биохимия*. 1981. Т. 46, вып. 10. С. 1768—1772.
- Голдовский А. М. Значение множественности представителей каждой группы веществ в организации Эволюц. биохимия и физиология. 1972. Т. 8, № 4. С. 353—357.
- Гольдштейн Б. Н., Лившиц М. А., Волькенштейн М. В. О кинетических проявлениях конформационных изменений ферментов // *Молекуляр. биология*. 1974. Т. 8, № 5. С. 784—791.
- Дженсен Ю. Этилен и полнацетилены // *Биохимия растений*. М.: Мир, 1968. 624 с.
- Дзантиев Б. Б., Егоров А. М. Современное состояние и перспективы развития иммуноферментного анализа // *Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева*. 1982. Т. 27, № 4. С. 442—449.

- Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Наука, 1966. 816 с.
- Дорохов Ю. Л. Транспорт вирусной инфекции и устойчивость растений к вирусам (обзор) // С.-х. биология. 1985. № 11. С. 30—38.
- Духарев Н. А., Синиговцев М. Е., Тютчев С. Л. Белки-маркеры чужеродного генетического материала, обуславливающего устойчивость пшеницы к ржавчинным и мучнисторосяным грибам // Там же. 1983. № 6. С. 83—90.
- Дьяков Ю. Т. Физиолого-биохимические механизмы устойчивости растений к грибным болезням // Итоги науки и техники. Защита растений. М.: ВИНТИ, 1983. Т. 3. С. 5—90.
- Журавлев Ю. Н. Фитовирусы в целом растениях и модельных системах. М.: Наука, 1979. 247 с.
- Запрометов М. Н. Основы биохимии фенольных соединений. М.: Высш. шк., 1974. 214 с.
- Запрометов М. Н. Фенольные соединения растений: биосинтез, превращения и функции // Новые направления в физиологии растений. М.: Наука, 1985. С. 1—286.
- Запрометов М. Н., Ермакова С. А., Арзуманян В. Т. Мембраносвязанные ферменты биосинтеза фенольных соединений. Активность микросомальных 4-гидроксилазы транс-коричной кислоты и фенилаланинаммиак-лиазы на ранних стадиях развития проростков ячменя // Биохимия. 1985. Т. 50, № 7. С. 1175—1182.
- Запрометов М. Н., Загоскина Н. В., Стрекова В. Ю., Субботина Г. А. Локализация пероксидазы и лигнина в тканях чайного растения и полученных из них каллусных культурах // Физиология растений. 1982. Т. 29, № 2. С. 302—311.
- Иванова Т. М., Давыдова М. А., Рубин Б. А. О пероксидазе митохондрий и ее вероятной роли в окислительных процессах // Биохимия. 1966. Т. 31, № 6. С. 1167—1173.
- Иванова Т. М., Давыдова М. Я., Рубин Б. А. О каталитических функциях пероксидазы // Там же. 1967. Т. 32, вып. 3. С. 607—611.
- Иванова Т. М., Рубин Б. А. О природе фенолоксидазного действия пероксидазы // Биохимия. 1962. Т. 27, вып. 4. С. 622—630.
- Иванова Т. М., Рубин Б. А. Об окислении кодегидразы I пероксидазой // ДАН СССР. 1963. Т. 150, вып. 2. С. 414—416.
- Иванова Т. М., Рубин Б. А., Давыдова М. А. О каталитических функциях пероксидазы хлоропластов // ДАН СССР. 1970. Т. 190, вып. 1. С. 214—217.
- Иштирякова Ф. Влияние фитогормонов на молекулярную гетерогенность пероксидазы в тканях гетерозисных гибридов кукурузы и их родительских форм // Вопросы физиологии и биохимии гетерозиса у растений. Уфа: БФАН, 1980. С. 67—74.
- Каррер П. Курс органической химии. Л., 1962. 1226 с.
- Качурин А. М., Фомицев В. Н. Геометрия комплексов пероксидазы хрена с ароматическими субстратами // Биофизика. 1982. Т. 27, № 2. С. 212—217.
- Кефели В. И. Рост растений в свете современных представлений о внутриклеточной регуляции // Успехи соврем. биологии. 1970. Т. 69, № 3. С. 446—459.
- Кефели В. И. Рост растений. М.: Колос, 1973. 120 с.
- Ковалев И. Е., Полевая О. Ю. Биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям. М.: Наука, 1985. 303 с.
- Ковалев И. Е., Полевая О. Ю., Данилова Н. П. Получение антител к канцерогену о-аминоазотолуолу с помощью конъюгированных антигенов, синтезированных химическими и ферментативными методами // Эксперим. онкология, 1984. № 1. С. 18—24.
- Коваленко А. Г. Природные механизмы ограничения вирусных инфекций у растений и пути их практического использования // Итоги науки и техники. Защита растений. М.: ВИНТИ, 1983. Т. 3. С. 91—169.
- Коваленко А. Г., Щербатенко И. С. Локализация инфекции и развитие индуцированной устойчивости к ВТМ у *Nicotiana glauca* Ternov и *Nicotiana tabacum* L. // Микробиол. журн. 1986. Т. 48, № 4. С. 51—55.
- Кожанова О. Н., Аксенова В. А. Некоторые свойства пероксидазы здоровых и зараженных *Botrytis cinerea* тканей капусты // Прикл. биохимия и микробиология. 1976. Т. 12, № 5. С. 753—758.

- Конарев В. Г. Белки растений как генетические маркеры. М.: Колос, 1983. 320 с.
- Конарев В. Г. Принципы и методы белковых маркеров в прикладной ботанике, генетике и селекции // С.-х. биология. 1985. № 11. С. 3—14.
- Кретович В. Л. Основы биохимии растений. М.: Высш. шк., 1986, 504 с.
- Ксендзова Э. Н. Прием количественного определения фенольных соединений в растительных тканях // Бюл. Всесоюз. НИИ защиты растений. 1971. № 20. С. 55—58.
- Кулаева О. Н. О регуляции экспрессии генов в растительных клетках // Физиология растений. 1978. Т. 25, вып. 5. С. 990—1008.
- Курсанов А. Л. Синтез и превращение дубильных веществ в чайном растении // 7-е Баховское чтение. М.: Изд-во АН СССР. 1952. 52 с.
- Ладыгина Е. А. Влияние заражения вирусом Y на белково-ферментный комплекс растений картофеля // Тр. НИИКС. 1971. Вып. 8. С. 14—19.
- Ладыгина Е. А., Князев В. А., Липиц Д. В. Изменение белково-ферментного комплекса при заражении растений вирусами Y и X // Иммунология и покой растений. М.: Наука, 1972. С. 121—141.
- Ладыгина М. Е. Применение метода инфракрасной спектроскопии для характеристики белков дыхательного аппарата // Большой практикум по физиологии растений. М.: Высш. шк., 1975. С. 370—380.
- Ладыгина М. Е., Таймла Э. А., Рубин Б. А. Особенности изоэнзимного состава пероксидазы и полифенолоксидазы при вирусном патогенезе у табака // Физиология растений. 1970. Т. 17, № 5. С. 928—935.
- Лебедева О. В., Угарова Н. Н., Березин И. В. Кинетическое изучение реакции окисления о-данилизидина перекисью водорода в присутствии пероксидазы из хрена // Биохимия. 1977. Т. 42, вып. 8. С. 1372—1379.
- Лебедева О. В., Угарова Н. Н., Березин И. В. Совместное окисление ферроцианида калия и о-данилизидина перекисью водорода, катализируемое пероксидазой из хрена. Субстрат-субстратная активация // Там же. 1981. Т. 46, вып. 7. С. 1202—1209.
- Ленинджер А. Биохимия: В 3 т. М.: Мир, 1985. Т. 3. С. 740—1056.
- Лисицына Р. А., Рахимбаев И. Электрофоретическое изучение пероксидазы, полифенолоксидазы и оксидазы идиолуксусной кислоты у растений тюльпана // Физиология растений. 1974. Т. 21, № 6. С. 1174—1177.
- Луговской Э. В., Кивенко Н. В. Об истинности убеждений в научном познании // Укр. биохим. журн. 1985. Т. 57, № 6. С. 95—100.
- Луковникова Г. А., Казакова А. А., Гаврилова В. П. Белковый комплекс и активность некоторых окислительных ферментов Allium sera L., пораженных Peronospora schl. // Физиология растений. 1969. Т. 16, вып. 1. С. 124—130.
- Маргна У. В. О месте биосинтеза флавоноидов в общей системе метаболизма растений // Журн. общ. биологии. 1980. Т. 41, № 1. С. 68—79.
- Маргна У. В., Лаанест Л. Э. Катаболические превращения полифенолов в растениях // Физиология и биохимия культур растений. 1980. Т. 12, № 3. С. 227—237.
- Метлицкий Л. В., Озерецковская О. Л. Индуцирование у растений устойчивости к инфекционным болезням // Успехи соврем. биологии. 1981. Т. 92, вып. 3(6). С. 406—421.
- Метлицкий Л. В., Озерецковская О. Л. Как растения защищаются от болезней. М.: Наука, 1985. 188 с.
- Метлицкий Л. В., Озерецковская О. Л., Савельева О. Н. и др. Участие кофейной кислоты и продуктов ее ферментативного превращения в защитных реакциях картофеля против Phytophthora infestans // ДАН СССР. 1972. Т. 202, № 1. С. 228—231.
- Миронова Г. Д., Сирота Т. В. Участие пероксидазы и не опосредованного цитохромоксидазой действия кислорода в процессах образования АТФ // Биофизика сложных систем и радиационных нарушений. М.: Наука, 1977. С. 1—287.
- Михлин Д. М. Пероксиды и пероксидазы. Химизм медленного окисления. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1947. 209 с.
- Молоков Л. Г., Яковлев Б. В., Аleshин Е. П. Активность цитохромоксидазы, полифенолоксидазы и пероксидазы в проростках риса при засолении субстрата // Физиология растений. 1973. Т. 20, вып. 6. С. 1170—1175.
- Мэтьюз Р. Влияние на метаболизм

- растений // Вирусы растений. М.: Мир, 1973. С. 235—257.
- Омельченко С. И., Андреева В. А. Фермент пероксидазы в пораженных растениях // Метаболизм больного растения. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1976. Т. 40 (143). С. 21—44.
- Омельченко С. И., Андреева В. А. Некоторые данные о топографии активности пероксидазы и полифенолоксидазы в разных долях листьев картофеля при заражении вирусом // Вирусные болезни растений. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1981. Вып. 11. С. 21—26.
- Панковская А. А., Латыпов А. З., Богданов Л. В. Результаты электрофоретического изучения пероксидазы у видов и индуцированных мутантов пшеницы // Вестн. АН БССР. Сер. биол.н. 1974. Т. 1. С. 33—34.
- Пейве Я. В., Иванова Н. Н., Дробышева Н. И. Нитратвосстанавливающая активность растительной пероксидазы // Физиология растений. 1972. Т. 19, вып. 2. С. 340—347.
- Петров Р. В. Иммунология. М.: Медицина. 1982. 368 с.
- Попов В. Р. Об окислительных ферментах чая // Биохимия. 1965. Т. 30, вып. 6. С. 1137—1140.
- Рамазанова Л. Х., Мифтахутдинова Ф. Г., Алексеева В. Я. К вопросу об активном центре оксидазной функции пероксидазы // Там же. 1971. Т. 36, вып. 1. С. 67—71.
- Редькин П. С. Изоферменты как элементы регуляторных систем гомеостаза // Успехи соврем. биологии. 1974. Т. 78, вып. 1 (4). С. 42—56.
- Рейфман В. Г., Колесникова С. А. Вакцинация — прием, снижающий ущерб от вирусных болезней картофеля. 1. Выделение из природной популяции слабо- и сильнопатогенных штаммов Х-вируса // Вирусные болезни растений ДВ. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1973. Вып. 4. С. 92—98.
- Роговин В. В., Пирюзян Л. А., Муравьев Р. А. Пероксисомы. М.: Наука, 1977. 207 с.
- Рубин Б. А. О биохимических механизмах антимикробialного иммунитета растений // Биол. науки. 1966. Т. 2. С. 7—12.
- Рубин Б. А. Биохимия иммунитета растений // С.-х. биология. 1969. Т. 4, вып. 5. С. 643—656.
- Рубин Б. А. Молекулярно-биологические аспекты проблемы патогенеза и иммунитета растений // Там же. 1975. Т. 10, № 4. С. 483—496.
- Рубин Б. А., Аксенова В. А., Кожанова О. Н. Новообразование белка пероксидазы в тканях капусты под влиянием заражения *Boltytis sinegea* // ДАН СССР. 1973. Т. 210, № 2. С. 485—488.
- Рубин Б. А., Арциховская Е. В., Аксенова В. А. Биохимия и физиология иммунитета растений. М.: Высш. шк., 1975. 320 с.
- Рубин Б. А., Будилова Е. В. Об изоферментах пероксидазы в клубне картофеля // ДАН СССР, 1970. Т. 190, вып. 3. С. 722—724.
- Рубин Б. А., Воронков Л. А., Капустина Г. И. Об участии пероксидазы в окислительных превращениях НАДФ·H₂ // Биохимия. 1968. Т. 33, вып. 1. С. 121—125.
- Рубин Б. А., Зеленева И. В. Влияние разных штаммов ВТМ на содержание пигментов и активности железосодержащих ферментов в листьях *Nicotiana tabacum* L. // Вестн. МГУ. Сер. биол., почвовед. 1964. Вып. 6. С. 46—50.
- Рубин Б. А., Карташова Е. Р. Совместимость как одна из сторон проблемы иммунитета растений // Вестн. с.-х. науки. 1970. Т. 10. С. 3—10.
- Рубин Б. А., Ладыгина М. Е. Физиология и биохимия дыхания растений. М.: Изд-во МГУ, 1974. 512 с.
- Рубин Б. А., Ладыгина М. Е., Таймла Э. А. Изменения в белковом комплексе при фитопатогенезе // Успехи соврем. биологии. 1974. Т. 78, вып. 3 (6). С. 453—468.
- Рубин Б. А., Логинова Л. Н. Альтернативные пути биологического окисления // Итоги науки и техники. Биологическая химия. М.: ВИНТИ, 1973. Т. 6. С. 1—196.
- Рубин Б. А., Луцинская Е. Н. Динамика компонентов пероксидазы листьев кукурузы при поражении пузырчатой головней // Биохимия. 1969. Т. 34, вып. 4. С. 674—678.
- Саундерс Б. К. Пероксидазы и каталазы: Неорганическая биохимия: В 2 т. / Под ред. Г. Эйхгорна. М.: Мир, 1978. Т. 2. С. 434—468.
- Сафонов В. И., Сафонова М. П. Анализ белков растений методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле // Физиология растений. 1969. Т. 16, вып. 2. С. 350—357.

- Сафонова М. П., Сафонов В. И., Дежежер Р. Специфика белков и изоферментов в функционально различных органах гороха // С.-х. биология. 1970. Т. 5, вып. 5. С. 687—692.
- Серов О. Л. Генетика изoenзимов // Генетика. 1968. Т. 4, вып. 10. С. 134—145.
- Смит А. Прикладная ИК-спектроскопия. М.: Мир, 1982. 327 с.
- Созинов А. А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука, 1985. 272 с.
- Строев Е. А. Биологическая химия. М.: Высш. шк., 1986. 480 с.
- Сулейманов И. Г., Рамазанова Л. Х., Алексеева В. А. Об изоферментах пероксидазы листьев озимой ржи // ДАН СССР. 1972. Т. 202, вып. 3. С. 718—720.
- Сухоруков К. Т. О состоянии и развитии учения об иммунитете растений // Физиология иммунитета растений. М.: Наука, 1968. С. 1—172.
- Титов А. Ф. Изопероксидазы растений // Успехи соврем. биологии. 1975. Т. 80, вып. 1(4). С. 102—115.
- Титов А. Ф. Генетика растительных изоферментов // Там же. 1978. Т. 85, вып. 3. С. 325—339.
- Туманова С. Ю. Роль гликопротеинов, гликолипидов в межклеточных взаимодействиях // Биохимия. 1978. Т. 43, вып. 3. С. 387—398.
- Тупик Н. Д. Изоферменты пероксидазы та ауксиноксидазы десятих синьо-зеленых та зеленых водорослей // Укр. ботанич. журн. 1972. Т. 29, вып. 1. С. 106—109.
- Тютчев С. Л., Духарев Н. А., Крупнов В. А. Использование белковых маркеров в оценке мягкой пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине // Докл. ВАСХНИЛ. 1983. № 7. С. 18—20.
- Угарова Н. Н., Бровко Л. Ю., Рожкова Г. Д., Березин И. В. Влияние химической модификации на термическую стабильность пероксидазы хрена // Биохимия. 1977. Т. 42, вып. 7. С. 1212—1220.
- Угарова Н. Н., Лебедева О. В. Структура и функция пероксидазы из хрена // Там же. 1978. Т. 43, вып. 10. С. 1731—1740.
- Уилкинсон Д. Изоферменты. М.: Мир, 1968. 220 с.
- Урманцев Ю. А., Пронина Н. Д. Проблемы устойчивости растений в трудах П. А. Генкеля // Физиология растений. 1986. Т. 33, вып. 3. С. 793.
- Хесин Р. Б. Современные проблемы молекулярной генетики // Генетика. 1975. № 11. С. 154—170.
- Хесин Р. Б. Непостоянство генома // Молекуляр. биология. 1980. Т. 14, вып. 6. С. 1205—1233.
- Чиркова Т. В., Соколовская Е. Л., Хазова И. В. Активность и изоферментный состав пероксидазы корней растений в зависимости от условий временного анаэробизма // Физиология растений. 1973. Т. 20, вып. 6. С. 1236—1241.
- Шафран М. Г. Миелопероксидаза нейтрофильных лейкоцитов // Успехи соврем. биологии. 1981. Т. 92, вып. 3(6). С. 365.
- Эльберсгейм П., Дарвилл Г. Олигосахариды // В мире науки. 1985. № 11. С. 16—23.
- Яска В., Яска В. Изоферментные системы вегетативных органов картофеля // Изв. АН ЭССР. Биология. 1971. Т. 20, № 3. С. 195—201.
- Янкулова М., Качармазов В. Тъканни култури и вирусна диагностика // Селскостоп. наука. 1984. Т. 22, № 5. С. 12—18.
- Abeles F. B., Florrense L. E. Temporal and hormonal control of β -1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris*. L. // Plant Physiol. 1970. Vol. 45, N 6. P. 395—400.
- Adams D. C., Yang S. F. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. Vol. 76, N 1. P. 170—174.
- Aibara S., Kobayashi T., Morita G. Isolation and properties of basic isoenzymes of horseradish peroxidase // J. Biochem. 1981. Vol. 90, N 1. P. 489—496.
- Alghisi P., Dizenna P., Margo P. Ricerche sull'assidase dell'acido indolacetico (IAA) in piante sane e ammalate. Nota 11. Pwolicazione e confronto delle attivita IAA essidastica e perossidastica in piante sane di mais suscettibili e resistenti all'Ustilago zeae // Riv. patol. veg. 1971. Vol. 7, N 3. P. 189—202.
- Ando G., Ehara G., Jumanaka S. Release of antifungal phenolic compounds from cucumber mosaic virus-infected and noninfected compea protoplasts // Phytopathol. Ztschr. 1984. Bd. 110, H. 2. S. 354—359.

- Andrew L., Shaw M. A note on the effect rust infection on peroxidase isozymes in flax // *Canad. J. Bot.* 1965. Vol. 43, N.11. P. 1479.
- Antoniw I. F., Pierpoint W. S. The purification and properties of one of the "b" proteins from virus-infected tobacco plants // *J. Gen. Virol.* 1978. Vol. 39, P. 343—350.
- Antoniw I. F., Ritter C. E., Pierpoint W. S., Van Loon L. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV // *Ibid.* 1980. Vol. 47, N 1. P. 79—87.
- Antoniw I. F., White R. F. The effects of aspirin and polyacrylic acid on soluble leaf proteins and resistance to virus infection in five cultivars of tobacco // *Phytopathol. Ztschr.* 1980. Bd. 98, H. 2. S. 331—341.
- Atabecov I. G., Dorokhov J. L. Plant virus-specific transport function and resistance of plants to viruses // *Adv. Virus Res.* 1984. Vol. 29. P. 313—364.
- Arora G. K., Bajaj K. L. Peroxidase and polyphenol oxidase associated with induced resistance of bean to *Rhizoctonia solani* Kuhn. // *Phytopathol. Ztschr.* 1985. Bd. 114, H. 1. S. 325—331.
- Avigliano L., Carrelli V., Casini A. et al. Oxidation of NAD dimers by horseradish peroxidase // *Biochem. J.* 1985. Vol. 226, N 2. P. 391—395.
- Aurameas S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of deflection of antigens and antibodies // *Immunochemistry.* 1969. Vol. 6, N 1. P. 43—52.
- Baglioni C. Interferon-induced enzymatic activities and their role in the antiviral state: Review // *Cell.* 1979. Vol. 17, N 2. P. 255—264.
- Balazs E., Gaborajanyi R., Toth A., Kiraly Z. Ethylene production in Xanthi tobacco after systemic and local virus infections // *Acta phytopathol. Acad. sci. hung.* 1969. Vol. 4, N 2. P. 355—358.
- Balazs E., Barna B., Kiraly Z. Heat-induced local lesions with high peroxidase activity in systemic host of TMV // *Ibid.* 1977. Vol. 12, N 3. P. 151—156.
- Bates D. C., Chant S. R. Alteration in peroxidase activity and peroxidase isozymes in virus-infected plants // *Ann. Appl. Biol.* 1970. Vol. 65, N 1. P. 105—110.
- Beart J. E., Lilley T. H., Haslam E. Plant polyphenol-secondary metabolism and chemical defence: some observations // *Phytochemistry.* 1985. Vol. 24, N 1. P. 33—38.
- Bell A. A. Biochemical mechanisms of disease resistance // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1981. Vol. 32. P. 21—81.
- Bercks R., Querfurth Y., Lesemanu D. IgY in IgM antibodies in distant serological relation of plant pathogenic viruses // *Phytopathol. Ztschr.* 1974. Bd. 80, H. 3. S. 233—243.
- Birecka H., Miller A. Cell wall and protoplast isoperoxidases in relation to injury, indoleacetic acid and ethylene effects // *Plant Physiol.* 1974. Vol. 53, N 4. P. 569—574.
- Birecka H., Briber K. A., Catalfamo Y. J. Comparativ studiese on Tobacco pith and sweet potato root isoperoxidases in relation to injury, indoleacetic acid and ethylene effects // *Ibid.* 1973. Vol. 52, N 1. P. 43—49.
- Birecka H., Catalfamo J. L., Urbano P. Cell wall and protoplast isoperoxidases in tobacco plant in relation to mechanical injury and infection with tobacco mosaic virus // *Ibid.* 1975. Vol. 5, N. 4. P. 611—619.
- Borchert R. Isoperoxidases as markers of the woundinduced differentiation pattern in potato tubers // *Develop. Biol.* 1974. Vol. 36, N 2. P. 391—399.
- Borris H. Über Zusammenhänge zwischen Enzym-Aktivität und Alterung (Seneszenz) pflanzlicher Gewebe // *Biol. Rdsch.* 1972. Bd. 10, H. 1. S. 66—67.
- Botosaneanu J. Izoperoxidazele din mazăre (*Pisum sativum*) in cursue germinatiei // *Stud. și cerc. bichim.* 1968. Vol. 11, N 3. P. 247—253.
- Brignac P. J., Tien-hua Yu. The oxidation of guaiacol, serotonin, o-cresol, p-cresol, m-cresol, homovanillic acid, and m-tirosine by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide // *Anal. Lett.* 1975. Vol. 8, N 5. P. 315—322.
- Brown A. E., Swinburne T. R. Benzoic acid antifungal compound formed in Bramley's Seedling apple fruits following infection by *Nectria galligena* Bres. // *Physiol. Plant Pathol.* 1971. Vol. 1, N 3. P. 469—475.
- Bujarski J. Mechanizmy odpornosci roslin na zakazenie wirusowe // *Post. biocem.* 1980. T. 26, N 2. S. 477—497.
- Burlina A. Isoenzymes as diagnostic in-

- dicators // Trends Enzymol. 1980. Vol. 61. P. 115—129.
- Chance B.* The properties of the enzyme-substrate compounds of horse-radish and lactoperoxidase // Science. 1949. Vol. 109. N. 103. P. 204—208.
- Chance B.* Physical limitations to sensitivity in the recording of rapid enzyme reactions within living cells // Trans. N. Y. Acad. Sci. 1954. Vol. 16, N 5. P. 250—261.
- Chandra G. R., Spencer M.* Ethylene production by sub-cellular particles from tomatoes // Nature. 1962. Vol. 194, № 4826. P. 361—364.
- Chant S. R., Bates D. C.* The affect of tobacco mosaic virus and potato virus X on peroxidase activity and peroxidase isozymes in Nicotina glutinosa // Phytochemistry. 1970. Vol. 9, N 11. P. 2323—2326.
- Chessin M.* Interference in plant virus infection of ultraviolet light and systemic acquired resistance // Phytopathol. Ztschr. 1982. Bd. 104, H. 3. S. 283—297.
- Chibbar R. N., Van Huystee R. B.* Characterization of peroxidase in plant cells // Plant Physiol. 1984. Vol. 75, № 4. P. 956—958.
- Claiborne A., Fridovich I.* Chemical and enzymatic intermediate in the peroxidation of o-dianisidine by horseradish peroxidase // Biochemistry. 1979. Vol. 18, № 11. P. 2324—2329.
- Clare B., Weber D. J., Stahmann M. A.* Peroxidase and resistance to ceratocyst in sweet potato increased by volatile material // Science. 1966. Vol. 153, N 3731. P. 62—63.
- Clementi F., Palade C. E.* Intestinal capillaries. I Permeability to peroxidase and ferritin // J. Cell Biol. 1969. Vol. 41, N 1. P. 33—58.
- Conti G. G., Bocci A. M., Sprocati M. T.* Peroxidase and polyphenoloxidase isoenzymes, hypersensitive reaction and systemic induced resistance in Nicotiana glutinosa L. infected with tobacco mosaic virus // Riv. patol. veg. Ser. VI. 1982. Vol. 18, N 1/2. P. 83—102.
- Conti G. J., Vegetti G. A., Rossi E.* Systemic resistance induced by a strain of alfalfa mosaic virus in Phaseolus vulgaris L. // Acta phytopathol. Acad. sci. hung. 1978. Vol. 13, № 1/2. P. 1—19.
- Corner J. J., Swain T.* Enzymatic synthesis of the sugar esters of hydroxyaromatic acids // Nature. 1965. Vol. 207, N 4997. P. 634—635.
- Daly J. M., Knoche H. W.* Hormonal involvement in metabolism of host-parasite interactions // Biochem. Aspects Plant-Parasite Relationships: Proc. Phytochem. Soc. Symp., Hull, Apr. 1975. L.: Annual proceedings the phytochemical Society N 13. 1976. P. 117—133.
- Danner D., Brignac P., Arceneaux D.* The oxidation of phenol and its reaction product by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide // Arch. Biochem. and Biophys. 1973. Vol. 156. P. 759—763.
- Davis B. J.* Disc electrophoresis. 2. Metod and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1964. Vol. 121, N 2. P. 404—427.
- Demirevska-Kepova K. N., Vassileva V. S.* Additional properties of the peroxidase // Dokl. Bolg. AN. 1985. Vol. 38. N 8. P. 1037—1040.
- Dezsi L., Palfi G., Farkas G.* A Beteg és sérült növényil szövetek peroxidáz aktivitás növekedésének ujmagyarázata // Bot. közl. 1971. K. 58. N 2. Old. 71—76.
- Duchesne M., Fritig B., Hirth L.* Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco mosaic-virus-infected hypersensitive tobacco-density-labelling evidence of de novo synthesis // Biochim. et biophys. acta. 1977. Vol. 485. N 2. P. 465—481.
- Dumitrescu M., Cartior D.* Etude électrophorétique des isoperoxydases chez quelques espèces du genre Plantago (Tourn.) L. // C. r. Acad. sci. D. 1971. Vol. 272, N 11. P. 1495—1498.
- Dunford H. B., Stillman J. S.* On the function and mechanism of action of peroxidases // Coord. Chem. Rev. 1976. Vol. 19, N 3. P. 187—251.
- Edreva A.* A study of the isoenzyme composition of peroxydase and malatedehydrogenase in Peronospora tabacina Adm. and its host Nicotiana tabacum L. // Dokl. Bolg. AN. 1972. Vol. 5, N 2. P. 121—125.
- Edreva A.* Biochemical study of tobacco blue-mould pathogenesis. II. Changea in the pattern of phenolic compounds // Dokl. s.-x. Acad. NRB. 1974. Vol. 7, N 3. P. 17—21.
- Evensen K. B.* Calcium effects on ethylene and ethane production and L-aminocyclopropane-l-carboxylic-acid content in potato disks // Physiol. plant. 1984. Vol. 60, № 2. P. 125—128.
- Faccioli G.* Relation of peroxidase, catala-

- se and polyphenoloxidase to acquire resistance in plants of *Chenopodium amaranticolor* locally infected by tobacco necrosis virus // *Phytopathol. Ztschr.* 1979. Bd. 95, H. 3. S. 237–249.
- Farkas G. L., Kiraly Z.* Role of phenolic compounds in the physiology of plant diseases and disease resistance // *Ibid.* 1962. Bd. 44, H. 1. S. 105–110.
- Farkas G. L., Stahmann M. A.* On the nature of changes in peroxidase isoenzymes in bean leaves infected by southern bean mosaic virus // *Phytopathology.* 1966. Vol. 56, N 6. P. 669–677.
- Ferri M. V., Guzman C. A.* The isoperoxidases from leaves of some species of the genus *Datura* // *Fyton.* 1970. Vol. 27, N 2. P. 137–140.
- Floris G., Medda R., Rinadi A.* Peroxidase from *Ipomoea batatas* seedlings: purification and properties // *Phytochemistry.* 1984. Vol. 23, N 8. P. 1527–1529.
- Fox L. R., Purves W. K.* Mechanism of enhancement of IAA oxidation by 2,4-dichlorophenol // *Plant Physiol.* 1968. Vol. 43, N 3. P. 454–458.
- Fraser R. S. S.* Evidence for the occurrence of the «pathogenesis-related» proteins in leaves of healthy tobacco plants during flowering // *Physiol. Plant Pathol.* 1981. Vol. 19, N 1. P. 69–76.
- Fraser R. S. S., Clay C. M.* Pathogenesis-related proteins and acquired systemic resistance: causal relationship or separate effects? // *Neth. J. Plant Pathol.* 1983. Vol. 89, N 6. P. 283–292.
- Fritig B., Legrand M., Hirth L.* Changes in the metabolism of tobacco to TMV // *Virology.* 1972. Vol. 47, N 3. P. 845–848.
- Fritig B., Legrand M., Kopp M. et al.* Régulation de l'activité d'enzymes du métabolisme des phénylpropanoïdes dans des tabacs hypersensibles infectés par le virus de la mosaïque du tabac // *Ann. Phytopathol.* 1976. Vol. 8. P. 123–126.
- Fritig B., Gosse J., Legrand M., Hirth L.* Changes in phenylalanine ammonia-lyase during the hypersensitive reaction of tobacco to TMV // *Virology.* 1973. Vol. 55, N 2. P. 371–379.
- Fromm H. J.* Use of competitive inhibitors in studying mechanism of action of some enzyme systems utilizing substrates // *Biochim. et biophys. acta.* 1967. Vol. 139, N 2. P. 221–230.
- Gaborjani R., Balazs E., Kiraly Z.* Ethylene production, tissue senescence and local virus infections // *Acta phytopathol. Acad. sci. hung.* 1971. Vol. 6, N 1. P. 51–55.
- Gahagan H. E., Holm R. E., Abeles F. B.* Effect of ethylene on peroxidase activity // *Physiol. plant.* 1968. Vol. 21, N 6. P. 1270–1279.
- Galston A. W., Davies P. J.* Hormonal regulation in higher plants // *Science.* 1969. Vol. 163, N 3873. P. 1288.
- Gaspar T., Penel C., Thorpe T., Grepin H.* Peroxidases. 1970–1980: A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Genève: Univ. de Genève, Centre de Botanique, 1982. 324 p.
- Gaspar T., Penel C., Castillo I., Grepin H.* A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development // *Physiol. plant.* 1985. Vol. 64.
- Gayer K. R., Glaszton K. T.* Plant enzyme synthesis: decay of messenger RNA for peroxidase in sugar-cane stem tissue // *Phytochemistry.* 1968. Vol. 7, N 8. P. 1247–1251.
- Georgiev C. Ch., Bakardjieva N. T., Georgiev G.* Peroxidase activity in plants occupying different taxonomic positions // *Fiziol. rast.* 1977. Vol. 24, N 1. P. 97–102.
- Gianinazzi S., Martin C. A.* naturally occurring active factor inducing resistance to virus infection in plants // *Phytopathol. Ztschr.* 1975. Bd. 83, H. 1. S. 23–24.
- Gianinazzi S., Ahl P., Cornu A., Scalla R.* First report of host b-protein appearance in response to a fungal infection in tobacco // *Physiol. Plant Pathol.* 1980. Vol. 16, N 3. P. 337–342.
- Gianinazzi S., Martin C., Vallee J. C.* Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana glauca* // *C. r. Acad. Sci. D.* 1970. Vol. 270, N 19, P. 2383–2386.
- Gibson D. M., Liu E. V.* Substrate specification of peroxidase isozymes in the developing pea seedling // *Ann. Bot.* 1978. Vol. 42, N 181. P. 1075–1083.
- Girste M., Suhacin G., Cirje M., Petec P.* Spontaneous formation of immunogenic

- conjugates by ortho- and para-amino-phenol // *Physiologie*. 1980. Vol. 17, N 1. P. 91—96.
- Glass A. D. M. Influence of phenolic acids on ion uptake // *Plant. Physiol.* 1973. Vol. 51, N 6. P. 1037—1041.
- Glass A. D. M., Dunlop J. Influence of phenolic acids on ion uptake. 4. Depolarization of membrane potentials // *Ibid.* 1974. Vol. 54, N 6. P. 855—858.
- Gleba Yn. Yn., Hoffmann F. Hybrid cell lines *Arabidopsis thaliana* and *Brassica*—*comprestris*: No evidence for specific chromosome elimination // *Mol. and Gen. Genet.* 1978. Vol. 165, N 3. P. 257—264.
- Groza H. A., Olteanu G. H. Peroxidase activity: a potential criterion in breeding for field resistance to *Rhytphthora infestans* // *Potato Res.* 1982. Vol. 25, N 1. P. 121—126.
- Grzelinska A. Peroxidase isoenzymes in *Fusarium*-infected tomato plants // *Phytopathol. Ztschr.* 1970. Bd. 69, H. 3. S. 212—222.
- Guzman C. A., Ferri M. V., Trippi V. S. Isoperoxidase in organs of two species of the genus *Datura* (Solana-ceae) // *Phytochemistry*. 1971. Vol. 10, N 10. P. 2389—2391.
- Hammerschmidt R., Kus J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber // *Physiol. Plant. Pathol.* 1982. Vol. 20, N 1. S. 61—71.
- Hammerschmidt R., Vuckles E. M., Kus J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber of *Colletotrichum lagenarium* // *Ibid.* P. 73—82.
- Hampton R. E. An oxidation product of chlorogenic acid in tobacco leaves infected with tobacco streak virus // *Phytopathology*. 1970. Vol. 60, N 11. P. 1677—1681.
- Harada G., Wada K. Studies on the auxin metabolism of some cereal crops in relation to growth and development // *Tohoku J. Agr. Res.* 1968. Vol. 19, № 1. P. 8—18.
- Harms H. Biosynthese und Metabolismus von Hydroxyzernsäuren und Bensäuren in gesunden und Braunrostinfizierten Gersten und Weizenkeimpflanzen // *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- und Forstwirt.* Berlin-Dahlem. 1984. № 223. S. 260—265.
- Harms H., Terbea M. Stoffwechsel phenolischer Verbindungen in gesunden und Braunrostinfizierten Gersten und Weizenvarietäten // *Phytopathol. Ztschr.* 1984. Bd. 3, H. 3/4. S. 283—296.
- Harris H. Genes and isozymes // *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* 1969. Vol. 174, N 1034. P. 1—31.
- Harrison B. D. Active resistance of plants to viruses // *Active defense mechanisms in plants*. N. Y.: Plenum press, 1982. P. 193—209.
- Hartenstein R., Veuhaese E. F., Mulligan R. M. Mechanism of action of lignins and lignin model compounds with horseradish peroxidase // *Phytochemistry*. 1977. Vol. 16, N 11. P. 1855—1857.
- Hartings H., Wijsman H. J. W. Genetics of the peroxidase isoenzymes in *Petunia*. 10. Location of the gene *prxD* // *Theor. and Appl. Genet.* 1985. Vol. 69, N 4. P. 349—351.
- Hedrick J. L., Smith A. J. Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1968. Vol. 126, N 2. P. 155—164.
- Herrero A., Hall W. C. General effects of ethylene on enzyme systems in the cotton leaf // *Physiol. plant.* 1960. Vol. 13, N 4. P. 736—750.
- Hidemasa I. Induction of peroxidase activity by ethylene in sweet potato // *Plant Physiol.* 1970. Vol. 46, N 1. P. 172—174.
- Ho H. H., Weaver E. Peroxidase isoenzymes of soybean roots from varieties resistant and susceptible to *Phytophthora megasperma* var. *sojae* // *Fiton.* 1970. Vol. 27, N 2. P. 163—167.
- Hoess R. H., Smith H. H., Stowell C. P. A genetic analysis of peroxidase isozymes in two species of *Nicotiana* // *Biochem. Genet.* 1974. Vol. 11, N 4. P. 319—323.
- Hofferek H., Wolfgang H. Beziehungen zwischen Enzymaktivitäten und Krankheitsresistenz von Pflanzen // *Biochem. und Physiol. Pflanz.* 1975. Bd. 168, H. 5/6. S. 597—606.
- Hoffori T., Ohta Y. Induction of phenylalanine ammonia-lyase activation and isoflavone glucoside accumulation in suspension cultured cells of red bean, *Vigna angularis*, by phytoalexin elicitors, vanadate, and elevation of medium pH // *Plant and Cell. Physiol.* 1985. Vol. 26, N 6. P. 1101—1110.

- Horiuchi Y., Imaseki H. High temperature sensitivity of auxin-induced ethylene production in mung bean hypocotyl sections // *Ibid.* 1986. Vol. 27, N 3. P. 453—461.
- Hoyle M. C. High resolution of peroxidase indoleacetic acid oxidase isoenzymes from horseradish by isoelectric focusing // *Plant Physiol.* 1977. Vol. 60, N 3. P. 787—793.
- Hunter R. L., Markert C. L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels // *Science*. 1957. Vol. 125, N 7. P. 1294—1310.
- Imaseki H., Kondo K., Watanabe A. Mechanism of cytokinin action on auxin-induced ethylene production // *Plant and Cell Physiol.* 1975. Vol. 16, N 5. P. 777—787.
- Jaaska V., Jaaska V. Heterogeneity and tissue specificity of some enzymes in kidney bean // *Eesti. NSV Tead. Acad. Toiment. Biol.* 1969. Vol. 18, N 4. P. 408—416.
- Jago G. R., Morrison M. Antistreptococcal activity of lactoperoxidase 3 // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1962. Vol. 111, N 3. P. 585—588.
- Jamet E., Kopp M., Fritig B. The pathogenesis-related proteins of tobacco: their labelling from (^{14}C) amino acids in leaves reacting hypersensitively to infection by tobacco mosaic virus // *Physiol. Plant Pathol.* 1985. Vol. 24, N 1. P. 29—41.
- Jansen E. F. Metabolism of labeled ethylene in the Avocado. II. Benzene and toluene from ethylene- ^{14}C ; benzene from ethylene- ^3H // *J. Biol. Chem.* 1964. Vol. 239, N 5. P. 1664—1668.
- Jennings A. C. The determination of dihydroxyphenolic compounds in extracts of plant tissues // *Anal. Biochem.* 1981. Vol. 118, N 2. P. 396—398.
- Johnson G., Scahal L. A. Accumulation of phenolic substrates and ascorbic acid in potato tuber tissue upon injury and their persistence // *Amer. Potato J.* 1957. Vol. 37, N 7. P. 200—209.
- Karege F., Penet C., Greppin H. Floral induction in spinach leaves by light, temperature and gibberellic acid: basic peroxidase activity as biochemical marker // *Plant Physiol.* 1982. Vol. 107, N 4. P. 357—365.
- Kassanis B. Therapy of virus-infected plants and the active defence mechanism // *Outlook Agric.* 1980. Vol. 10, № 6. P. 288—292.
- Kassanis B. Some speculation on the natural defence mechanism of plants against virus infection // *Phytopathol. Ztschr.* 1981. Bd. 102, H. 3. S. 277—291.
- Kassanis B., Gianinazzi S., White R. F. A possible explanation of the resistance to a second infection // *J. Gen. Virol.* 1974. Vol. 23. P. 11—16.
- Kawashima N., Hyodo H., Uritani I. Occurrence of peroxidases in sweet potato infected by the black rot fungus // *Arg. Biol. Chem.* 1963. Vol. 27, N 6. P. 409—417.
- Kawashima N., Hyodo H., Uritani I. Investigation of antigenic components produced by sweet potato in response to black rot infection // *Phytopathology*. 1964. Vol. 54, N 9. P. 1086—1092.
- Kay E., Shannon L., Lew J. Y. Peroxidase isozymes from horseradish root. II Catalytic properties // *J. Biol. Chem.* 1967. Vol. 242, N 10. P. 2470—2473.
- Kim S., Wender S. H., Smith E. C. Isolation and characterisation of two isoperoxidases from tobacco tissue cultures // *Phytochemistry*. 1980. Vol. 19, N 1. P. 165—168.
- Keenan P., Bryan J. B., Friend J. The elicitation of the hypersensitive response of potato tuber tissue by a component of the culture filtrate of *Phytophthora infestans* // *Physiol. Plant Pathol.* 1985. Vol. 26, N 3. P. 343—355.
- Klapper M. H., Hackett D. P. The oxidatic activity of horseradish peroxidase. I. Oxidation of hydro and naphthohydroquinones // *J. Biol. Chem.* 1963. Vol. 238, N 11. P. 3736—3742.
- Klapper M. N., Hackett D. P. Investigations on the multiple components of commercial horseradish peroxidase // *Biochem. et biophys. acta*. 1965. Vol. 96, N 2. P. 271—282.
- Klebanoff S. J. Myeloperoxidase — halidehydrogen peroxide antibacterial system // *J. Bacteriol.* 1968. Vol. 95, N 6. P. 2131—2138.
- Klebanoff S. J., Hamon C. B. Role of myeloperoxidase — mediated antimicrobial systems in intact

- leukocytes // J. Reticuloendoth. Soc. 1972. Vol. 12, N 1. P. 170—174.
- Klebanoff S. J., Clem W. H., Leubke R. G. The peroxidase-thiocyanate-hydrogen peroxidase antimicrobial system // Biochim. et biophys. acta. 1966. Vol. 117, N 1. P. 63—72.
- Kluge S. Proteingehalt in hell und dunkelgrünen Blattbezirken mosakranker Tabakpflanzen // Biochem. Physiol. Pflanzen. 1976. Bd. 170, N 1. S. 91—95.
- Kluge S. Physiological aspects of natural resistance of TMV infected tobacco plants // Zesz. probl. postepow nauk. rol. 1983. N 291. S. 163—171.
- Klusak H. Die Veränderungen der Peroxidasenaktivität von Weizen und Gerstenblättern nach der Infektion mit obligaten Parasiten // Biol. plant Acad. sci. bohemosl. 1970. Vol. 12, N 3. P. 224—230.
- Kobayashi S., Nakano M., Goto T. et al. An evidence of the peroxidase-dependent oxygen transfer from hydrogen peroxide to sulfides // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1986. Vol. 135, N 1. P. 166—171.
- Kojima S. Studies in peroxidase. II. The effect of peroxidase on the bactericidal action of phenols // J. Biochem. 1931. Vol. 14, N 1. P. 95—101.
- König D., Nienhaus F. Stoffwechselpathologische Veränderung in der Pflanze nach Virusinfektion unter Einfluss von Wundreiz. 1. Polyphenoloxydase-, Peroxydase-, Cytochromoxydase-aktivität // Phytopathol. Ztschr. 1970. Bd. 68, H. 3. S. 193—205.
- Kosuge T. The role of phenolic in host response to infection // Annu. Rev. Phytopathol. 1969. Vol. 7. P. 195—222.
- Kovalenko A. G. Experimental models for study of acquired plant resistance to viruses // Plant Virology: Proc. of the 9th conf. of the Czechosl. plant virologists. Brno. 1981. P. 81—84.
- Kus J., Ruih J. Phytoalexins // Arch. Biochem. and Biophys. 1985. Vol. 236, N 2. P. 455—472.
- Laat A. M. de, Van Loon L. C., Lonk C. R. Regulation of ethylene biosynthesis in virus-infected tobacco leaves. I. Determination of the role of methionine as the precursor of ethylene // Plant Physiol. 1981. Vol. 68, N 1. P. 256—260.
- Laat A. M. de, Van Loon L. C. Effects of temperature light and leaf age on ethylene production and symptom expression in virus-infected tobacco leaves // Physiol. Plant Pathol. 1983a. Vol. 22, N 2. P. 275—283.
- Laat A. M. de, Van Loon L. C. The relationship between stimulated ethylene production and symptom expression in virus-infected tobacco leaves // Ibid. 1983b. Vol. 22, N 2. P. 261—273.
- Lanzani G., Galante E. Peroxidase activities from wheat embryo ribosomes // Arch. Biochem. and Biophys. 1964. Vol. 106, N 1. P. 20—24.
- Lazar G., Farkas G. Patterns of enzyme changes during leaf senescence // Acta biol. Acad. sci. hung. 1970. Vol. 21, N 4. P. 389—396.
- Legrand M., Fritig B., Hirth L. Enzymes of the phenylpropanoid pathway and the necrotic reaction of hypersensitive to tobacco mosaic virus // Phytochemistry. 1976. Vol. 15, N 8. P. 1353—1359.
- Legrand M., Fritig B., Hirth L. *o*-Diphenol, *o*-methyltransferases of healthy and tobacco-mosaic-virus-infected hypersensitive tobacco // Planta. 1978. Vol. 144, N 1. P. 101—108.
- Lobarzewski J. Homoproteid peroxidase from *Inonotus radiatus* // Acta microbiol. pol. 1977. Vol. 26, N 2. P. 179—184.
- Lobarzewski J. Peroksydazy rosliny // Wiad. bot. 1981. T. 25, N 1. S. 29—44.
- Lobarzewski J., Trojanowski J. Induction by ferulic acid of multiple form of peroxidase in the fungus *Trametes versicolor* (Basidiomycetes) // Acta biochim. pol. 1979. Vol. 26, N 4. P. 309—317.
- Lobarzewski J., Wolski T. The function of free carboxyl groups in the action of peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase // Phytochemistry. 1985. Vol. 24, N 10. P. 2211—2213.
- Loebenstein G. Localization and induced resistance in virus-infected plants // Annu. Rev. Phytopathol. 1972. Vol. 10. P. 177—206.
- Van Loon L. C. Polyacrilamide disc-

- electrophoresis of soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. Samsun and Samsun NN. 4: Similarity of qualitative changes of specific proteins after infection with different viruses and their relationship to acquired resistance // *Virology*. 1975. Vol. 67, N 2. P. 566–575.
- Loon L. C. van. Specific soluble leaf proteins in virus-infected tobacco plants are not normal constituents // *J. Gen. Virol.* 1976a. Vol. 30. P. 375–379.
- Loon L. C. van. Systemic acquired resistance, peroxidase activity and lesion size in tobacco reacting hypersensitively to tobacco mosaic virus // *Physiol. Plant Pathol.* 1976b. Vol. 8, N 3. P. 231–242.
- Loon L. C. van. Induction by 2-chloroethyl-phosphonic acid of viral-like lesions associated proteins and systemic resistance in tobacco // *Virology*. 1977. Vol. 80, N 2. P. 417–420.
- Loon L. C. van. Effects of auxin on the localization of tobacco mosaic-virus in hypersensitively reacting tobacco // *Physiol. Plant Pathol.* 1979. Vol. 14, № 2. P. 213–226.
- Loon L. C. van. Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defence against virus infection // *Active defence mechanism in plants*. N. Y.: Plenum press, 1982. P. 247–273.
- Loon L. C. van, Geelen J. L. M. C. The relation of polyphenoloxidase and peroxidase to symptom expression in tobacco var. Samsun NN after infection with tobacco mosaic virus // *Acta phytopathol. Acad. sci. hung.* 1971. Vol. 6, N 1/2. P. 9–20.
- Loon L. C. van, Kammen A. van. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. Samsun and Samsun NN. 2. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus // *Virology*. 1970. Vol. 40, N 2. P. 199–211.
- Lowry O. R., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the folin-phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193, N 1. P. 265–275.
- Machackova I., Zmrhal Z. In peroxidase involved in ethylene biosynthesis? // *Physiol. plant.* 1981. Vol. 53, N 6. P. 479–482.
- Macnicol P. K. Isoperoxidase pattern and internode length genotype in *Pisum* // *Phytochemistry*. 1973. Vol. 12, № 6. P. 1273–1279.
- Mäder M. Die Lokalisation der Peroxidase Izoenzymgruppe G₁ in der Zellwand von Tabak-Geweden // *Planta*. 1976. Bd. 131, H. 1. S. 11–15.
- Mäder M. Origin of the heterogeneity of peroxidase isoenzyme group G₁ from *Nicotiana tabacum*. I. Conformation // *Ztschr. Pflanzenphysiol.* 1980. Bd. 96, H. 4. S. 283–296.
- Mäder M., Amberg-Fischer V. Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. I. Oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide and formation of hydrogen peroxide by cell wall peroxidases // *Plant Physiol.* 1982. Vol. 70, N 4. P. 1128–1131.
- Mäder M., Füssl R. Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. II. Regulation by phenolic compounds // *Ibid.* P. 1132–1134.
- Mäder M., Meyer Y., Bopp M. Lokalisation der Peroxidase-Isoenzyme in Protoplasten und Zellwänden von *Nicotiana tabacum* L. // *Planta*. 1975. Bd. 122, H. 3. S. 259–268.
- Mäder M., Nessel A., Bopp M. Über die physiologische Bedeutung der Peroxidase-Isoenzymgruppen des Tabaks anhand einiger biochemischer Eigenschaften // *Ztschr. Pflanzenphysiol.* 1977. Bd. 82, H. 3. S. 247–260.
- Mäder M., Ungemach J., Schlose P. The role of peroxidase isoenzyme groups of *Nicotiana tabacum* in hydrogen peroxide formation // *Planta*. 1980. Vol. 147, N 5. P. 467.
- Maehly A. C. Splitting of horseradish peroxidase into prosthetic group and protein as a means of studying the linkages between hemin and protein // *Biochim. et biophys. acta*. 1952. Vol. 8, N 1. P. 1–17.
- Malmberg A., Theander O. Analysis of chlogenic acid coumarins and feruloylputrescine in different parts of potato tubers infected with *Phoma* // *Swed. J. Agr. Res.* 1984. Vol. 14, N 2. P. 63–70.
- Mapson L. W., Wardale D. A. Biosynthesis of ethylene-enzymes involved in its formation from methional // *Biochem. J.* 1968. Vol. 107, N 3. P. 433–450.
- Maraite H. Changes in polyphenoloxidases and peroxidases in muskmelon (*Cucumis melo* L.) infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* // *Physiol. Plant Pathol.* 1973. Vol. 3, N 1. P. 29–49.

- Markert C. L.* Biology of isozymes // *BioScience*. 1975. Vol. 25, N 6. P. 365—368.
- Markert C. L., Möller F.* Multiple forms of enzymes tissue ontogenetic and specific patterns // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1959. Vol. 49, N 5. P. 753—763.
- Markert C. L., Whitt G. S.* Molecular varieties of isozymes // *Experientia*. 1968. Vol. 24, N 10. P. 977—991.
- Martin C., Gallet M.* Nouvelles observations sur le phénomène d'hypersensibilité aux chez les végétaux // *C. r. Acad. Sci. D*. 1966. Vol. 263, N 18. P. 1316—1318.
- Martin C., Scalla R., Meignoz R., Gallet M.* Electron microscopy in *Nicotiana Xanthi* nc. of living cells near a necrotic lesion caused by hypersensitivity to tobacco mosaic virus // *Ibid*. 1969. Vol. 268, N 17. P. 2183—2185.
- Matsuoka M., Ohashi Y.* Biochemical and serological studies of pathogenesis-related proteins of *Nicotiana* species // *J. Gen. Virol*. 1984. Vol. 65, N 12. P. 2209—2215.
- Matsuoka M., Ohashi Y.* Induction of pathogenesis-related proteins in tobacco leaves // *Plant Physiol*. 1986. Vol. 80, N 2. P. 505—510.
- Matsushita S., Ibuki F.* Peroxidase activity found in the ribonucleoprotein particles from pea seedling and rabbit liver // *Biochim. et biophys. acta*. 1960. Vol. 40, N 3. P. 540—542.
- Mazelis M.* The pyridoxal-phosphate-dependent oxidative decarboxylation of methionine by peroxidase. 1. Characteristic and properties of the reaction // *J. Biol. Chem*. 1962. Vol. 237, N 1. P. 104—108.
- Mazza G., Job C., Bouchet M.* Chemical composition and hydrodynamic characteristic of turnip peroxidases // *Biochim. et biophys. acta*. 1973. Vol. 322, N 2. P. 218—223.
- Merrett M. J., Sunderland D. W.* Metabolism of carbon-14 specifically labelled glucose in leaves showing tobacco mosaic virus induced local necrotic lesions // *Physiol. plant*. 1967. Vol. 20, N 3. P. 593—597.
- Mink G. I., Saksena K. N.* Studies on the mechanism of oxidative inactivation of plant viruses by o-quinones // *Virology*. 1971. Vol. 45, N 2. P. 755—763.
- Modderman P. W., Schot C. P., Klis F. M., Wieringa-Brants D. N.* Acquired resistance in hypersensitive tobacco against tobacco mosaic virus, induced by plant cell wall components // *Phytopathol. Ztschr*. 1985. Bd. 113, H. 2. S. 165—170.
- Moore A. F., Stone B. A.* Effect of infection with TMV and other viruses on the level a β -1,3-glucan hydrolase in leaves of *Nicotiana glutinosa* // *Virology*. 1972. Vol. 50, N 3. P. 791—799.
- Morita Y., Yoshida C., Maeda Y.* Properties and structures of peroxidase isoenzymes of japanese-radish // *Agr. Biol. Chem*. 1971. Vol. 35, № 7. P. 1074—1083.
- Moss D. W.* Isoenzymes. L.; N. Y.: Chapman and Hall, 1982. 204 p.
- Murakishi H. H., Carlson R. S.* Regeneration of virus-free plants from dark-green islands of tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves // *Phytopathology*. 1976. Vol. 66, N 7. P. 931—932.
- Nakagaki Y., Hirai T., Stahmann M. A.* Ethylene production by detached leaves infected with tobacco mosaic-virus // *Virology*. 1970. Vol. 40, N 1. P. 1—9.
- Nakajima S., Tomiyama K., Kinugawa M.* Distribution of rishitin and lubimin in potato tuber tissue infected by an incompatible race of *Phytophthora infestans* and the site where rishitin is synthesized // *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*. 1975. Vol. 41, N 1. P. 39—55.
- Nakov B. K., Vassilev G. N., Ivanov K. I.* et al. Activity of peroxidase and its isoenzymes in virus-affected hop plants (*Humulus Lupulus* L.) // *C. r. Acad. bulg. sci*. 1982. Vol. 35, N 10. P. 1423—1425.
- Nessel A., Mäder M.* Über die physiologische Bedeutung der Peroxidase-Isoenzymgruppen des Tabaks anhand einiger biochemischer Eigenschaften. I. Trennung, Reinigung chemische und physikalische Daten // *Ztschr. Pflanzenphysiol*. 1977. Bd. 82, H. 3. S. 235—246.
- Nishiguchi M., Motoyosh F., Oshima N.* Further investigation of a temperature-sensitive strain of tobacco mosaic-virus-its behavior in tomato leaf epidermis note // *J. Gen. Virol*. 1980. Vol. 46, N 2. P. 497—500.
- Novacky A., Hampton R. E.* Peroxidase isozymes in virus-infected plants // *Phytopathology*. 1968. Vol. 58, N 3. P. 301—305.
- Novikov V. K., Atabekov I. G.* A study

- of the mechanisms controlling the host-range of plant virus. I. Virus-specific receptors of *Chenopodium amaranticolor* // *Virology*. 1970. Vol. 41, N 1. P. 101—107.
- Odawara S., Watanabe A., Imaseki N.* Involvement of cellular membrane in regulation of ethylene production // *Plant and Cell Physiol.* 1977. Vol. 18, N 3. P. 569—575.
- Osman S., Moreau R.* Rotato phytoalexin elicitors in *Phytophthora infestans* spore germination fluids // *Plant Sci.* 1985. Vol. 41, N 2. P. 205—209.
- Pai C., Endo T., Oka H. T.* Genetic analysis for peroxidase isozymes and their organ specificity in *Oryza perennis* and *O. Sativa* // *Canad J. Genet. and Cytol.* 1973. Vol. 15, N 4. P. 845—853.
- Paradies I., Elstner E. F.* Wirt-Parasit-Beziehungen: Untersuchungen zur Induktion der Äthylenbildung in höheren Pflanzen und zur Rolle des Äthylens bei der Ansprängung von Krankheitssymptomen und der Einleitung von Abwehrreaktionen // *Ber. Dt. Bot. Ges.* 1980. Bd. 93, H. 3. S. 635—657.
- Paul K. G., Stigbrand T.* Four isoperoxidases from horseradish root // *Acta chem. scand.* 1970. Vol. 24, N 10. P. 3607—3617.
- Paul K. G., Theorell H., Akeson A.* The molar light absorption of pyridine ferroporphyrin (pyridine haemochromogen) // *Ibid.* 1953. Vol. 7, N 9. P. 1284—1287.
- Paynot M., Martin C., Girard M.* Activité phénylalanine ammoniac lyase et hypersensibilité au virus de la mosaïque du tabac de *Nicotiana tabacum* var. *Xanthi nc.* // *C. r. Acad. sci. D.* 1971. Vol. 273, N 4. P. 537—539.
- Paynot M., Martin C., Girard M.* Localisation de l'activité phénylalanine ammoniac lyase lors de la réaction d'hypersensibilité du *Nicotiana tabacum* var. *Xanthi nc.* au virus de la mosaïque du tabac // *Ibid.* 1973a. Vol. 276, N 4. P. 669—671.
- Paynot M., Martin C., Girard M.* Activité phénylalanine ammoniac lyase du *Nicotiana tabacum* var. *Xanthi nc.* et infection systémique par le virus de la mosaïque du tabac // *Ibid.* 1973b. Vol. 277, N 16. P. 1713—1715.
- Penel C., Gaspar Th., Greppin H.* Hormonal control of enzyme secretion by plant cells // *Hormonal regulation of plant growth and development* // *Agro-Bot. Publ. Ind.* 1984. Vol. 1. P. 145—168.
- Pennon P., Cecchini J., Miassod R. et al.* Peroxidases associated with lentil root ribosomes // *Phytochemistry*. 1970. Vol. 9, N 1. P. 73—86.
- Pierpoint W. S., Ireland R. J., Carenter J. M.* Modification of proteins during the oxidation of leaf phenols: reaction of potato virus X with chlorenchinone // *Ibid.* 1977. Vol. 16, N 1. P. 29—34.
- Pleniscar M., Bonner W. D., Storey B. T.* Peroxidase associated with higher plant mitochondria // *Plant Physiol.* 1967. Vol. 42, N 2. P. 366—370.
- Powell B. L., Pickering J. W., Wender S. H., Smith E. C.* Isoperoxidases from tobacco tissue cultures // *Phytochemistry*. 1975. Vol. 14, N 8. P. 1715—1717.
- Pritchard D. W., Ross A. F.* The relationship of ethylene to formation of tobacco mosaic lesions in hypersensitive responding tobacco leaves with and without induced resistance // *Virology*. 1975. Vol. 64, N 2. P. 295—307.
- Raa J.* Cytochemical localization of peroxidase in plant cells // *Physiol. plant.* 1973. Vol. 28, N 1. P. 132—133.
- Renneberg H., Steinkam R., Kesselme J.* 5-Oxo-prolinase in *nicotiana-tabacum*-catalytic properties and subcellular localization // *Ibid.* 1981. Vol. 52, N 2. P. 211—216.
- Reuveni R., Bothma G. C.* The relationship between peroxidase activity and resistance to *Sphaerotheca fuliginea* in melons // *Phytopathol. Ztschr.* 1985. Bd. 114, H. 3. S. 260—267.
- Rick C. M., Zobi R. W., Fober J. F.* Peroxidase loci red-fructed tomato species-genetics and geographic distribution // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1974. Vol. 71, N 3. P. 835—839.
- Riddle V. M., Maselis M.* Conversion of tryptophane to indoleacetic acid by plant preparations // *Plant Physiol.* 1965. Vol. 40, N 3. P. 481—484.
- Ringe I., Osborne D. J.* Hydroxyproline and peroxidases in cell walls of *Pisum sativum*: regulation by ethylene // *J. Exp. Bot.* 1970. Vol. 21, N 69. P. 843—856.
- Ringe I., Osborne D. J.* Role of peroxidase when hydroxyproline-rich protein in plant cell wall is increased by ethylene // *Nature new Biology*.

1971. Vol. 229, N 7. P. 205—208.
- Rioy J., Dror N., Goren R. Effect of ethylene on (14 C) indole-3-acetic acid metabolism in leaf tissue of woody plants // *Plant Physiol.* 1982. Vol. 70, N 5. P. 1265—1270.
- Roberts D. W. A comparison of peroxidase isozymes of wheat plants grown at 6° C and 20° C // *Canad. J. Bot.* 1969. Vol. 47, N 2. P. 263—265.
- Roberts D. A. Systemic acquired resistance induced in hypersensitive plants by nonnecrotic localised viral infections // *Virology.* 1982. Vol. 122, N 1. P. 207—209.
- Roberts D. A. Acquired resistance to tobacco mosaic virus transmitted to the progeny of hypersensitive tobacco // *Ibid.* 1983. Vol. 124, N 1. P. 161—163.
- Ross A. F. Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts // *Ibid.* 1961a. Vol. 14, N 3. P. 329—339.
- Ross A. F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants // *Ibid.* 1961b. Vol. 14, N 1. P. 340—358.
- Ross A. F., Pritchard D. W. Local and systemic effects of ethylene on tobacco mosaic virus lesions in tobacco (abstract) // *Phytopathology.* 1972. Vol. 62, N 2. P. 786.
- Ross A. F., Williamson C. E. Physiologically active emanations from virus infected plants // *Ibid.* 1951. Vol. 41, N 3. P. 431—438.
- Rücker W., Radola B. J. Isoelectric patterns of peroxidase isoenzymes from tobacco tissue cultures // *Planta.* 1971. Vol. 99, N 1. P. 192—198.
- Sahulka J. Electrophoretic study on peroxidase, indoleacetic acid oxidase, and *o*-diphenol oxidase fraction in extracts from different growth zone of *Vicia faba* L. roots // *Biol. plant.* 1970. Vol. 12, N 1. P. 191—198.
- Saijo R., Takeo T. Induction of peroxidase activity by ethylene and indole-3-acetic acid in tea shoots // *Agr. Biol. Chem.* 1974. Vol. 38, N 11. P. 2283—2284.
- Saksena K. N., Mink G. J. The effects of oxidized phenolic compounds on the infectivity of four „stable“ viruses // *Virology.* 1970. Vol. 40, N 2. P. 540—546.
- Sandmann G., Böeger P. Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes // *Plant Physiol.* 1980. Vol. 66, N 3. P. 797—800.
- Saunders B. C., Holmes-Siedle A. G., Stark B. P. Peroxidase: The properties and uses of a versatile enzyme and some related catalysts. L.: Butterworths, 1964. 271 p.
- Scalbert A., Monties B., Lallemand L.-Y. et al. Ether linkage between phenolic acids lignin fractions from wheat straw // *Phytochemistry.* 1985. Vol. 24, N 6. P. 1359—1362.
- Scandalios G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: A Review // *Biochem. Genet.* 1969. Vol. 3, N 1. P. 37—79.
- Scandalios J. C. Isozymes in development and differentiation // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1974. Vol. 25. P. 225—258.
- Schuster G., Flemming M. Studies on the formation of diffusion barrier in hypersensitive host of tobacco mosaic virus and the role of necrotization in the formation of diffusion barrier as well as the localization of infections // *Phytopathol. Ztschr.* 1976. Bd. 87, H. 4. S. 345—352.
- Seevers P. M., Daly J. M., Catadral F. F. Role of peroxidase isoenzymes in resistance to wheat stem rust disease // *Plant Physiol.* 1971. Vol. 48, N 3. P. 353—360.
- Sela J. Antiviral factors from virus infected plants // *Trends Biochem. Sci.* 1981. Vol. 6. P. 31—33.
- Shannon L. M. Plant isoenzymes // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1968. Vol. 19. P. 187—204.
- Shannon L. M., Kay E., Lew Y. Y. Peroxidase isoenzymes from horseradish roots. I. Isolation and physical properties // *J. Biol. Chem.* 1966. Vol. 241, N 9. P. 2166—2172.
- Shannon L. M., Uritani J., Imaseki H. De-novo synthesis of peroxidase isoenzymes in sweet potato slices // *Plant Physiol.* 1971. Vol. 47, N 4. P. 493—498.
- Sharon N. Lis-H-lectins-cell-agglutinating and sugar-specific proteins // *Sci. Amer.* 1974. Vol. 230, N 5. P. 78—86.
- Sheen S. J. Peroxidase in the genus *Nicotiana* // *Theor. and Appl. Genet.* 1970. Vol. 40, N 1. P. 18—25.
- Sheen S. J., Calvert J. Studies on polyphenol content, activities and isozymes of polyphenol oxidase and peroxidase during air-curing in

- three tobacco types // *Plant Physiol.* 1969. Vol. 44, N 2. P. 199—204.
- Sheen S. J., Diachun S. Peroxidases of red clover resistant and susceptible to bean yellow mosaic virus // *Acta phytopathol. Acad. sci. hung.* 1978a. Vol. 13, N 1/2. P. 21—28.
- Sheen S. J., Diachun S. Relationship of peroxidase and polyphenoloxidase activity to virus symptoms in red clover // *Ibid.* 1978b. Vol. 13, N 3/4. P. 243—253.
- Sheen S. J., Redagay G. R. On the localization and tissue difference of peroxidases in *Nicotiana tabacum* and progenitor species // *Bot. Gaz.* 1970. Vol. 131, N 4. P. 297—304.
- Shin J. H. C., Shannon L. M., Kay E., Lew J. Y. Peroxidase isoenzymes from horseradish roots // *J. Biol. Chem.* 1971. Vol. 246, N 14. P. 4546—4551.
- Shirata A., Tomiyama K., Doke N., Takahashi K. Increases in peroxidase and phenoloxidase-activities and production of antifungal substances in mulberry shoots following wounding or infection by pathogenic fungi // *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.* 1978. Vol. 44, N 1. P. 127—136.
- Siegel B. Z., Galston A. W. Indoleacetic acid oxidase activity of apoperoxidase // *Science.* 1967a. Vol. 157, N 3794. P. 1557—1559.
- Siegel B. Z., Galston A. W. The isoperoxidases of *Pisum sativum* // *Plant Physiol.* 1967b. Vol. 42, N 2. P. 221—226.
- Simons T. J., Ross A. F. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on size of tobacco mosaic virus lesions in hypersensitive tobacco // *Phytopathology.* 1965. Vol. 55, N 10. P. 1076.
- Simons T. J., Ross A. F. Enhanced peroxidase activity associated with induction of resistance to tobacco mosaic virus in hypersensitive tobacco // *Ibid.* 1970. Vol. 60, N 2. P. 383—384.
- Simons T. J., Ross A. F., Frank A. Metabolic changes associated with systemic induced resistance to tobacco mosaic virus in Samsun NN tobacco // *Ibid.* 1971. Vol. 61, N 3. P. 293—300.
- Smith H. H., Hamill D. E., Weaver E. A., Thompson K. H. Multiple molecular forms of peroxidase and esterases among *Nicotiana* species and amphiploids // *J. Hered.* 1970. Vol. 61, N 5. P. 203—204.
- Smith H. H., Hamill D. E., Weaver E. A., Thompson K. H. Multiple molecular forms of peroxidases and esterases among *Nicotiana* species and amphiploids // *Plant Physiol.* 1976. Vol. 57, N 6. P. 203—212.
- Sohi H. S., Raval P. D. Phenolic in resistance in cowpea // *Ind. J. Mycol. and Plant Pathol.* 1983. Vol. 13, N 1. P. 61—62.
- Solymosy Q., Szirmai J., Beezner L., Farkash G. L. Changes in peroxidase-isozyme patterns by virus infection // *Virology.* 1967. Vol. 32, N 2. P. 117—121.
- Sridhar R. Changes in peroxidase isoenzymes in blast diseased rice leaves // *Acta. phytopathol. Acad. sci. hung.* 1978. Vol. 13, N 1/2. P. 161—164.
- Srivastava O. P., van Huystee R. B. IAA oxidase and polyphenol oxidase activities of peanut peroxidase isozymes // *Phytochemistry.* 1977a. Vol. 16, N 10. P. 1527—1530.
- Srivastava O. P., van Huystee R. B. Interactions among phenolics and peroxidase isozymes // *Bot. Gaz.* 1977b. Vol. 138, N 4. P. 457—464.
- Stahmann M. A., Demorest D. M. Enzyme multiplicity and function in the regulation of divergent metabolic pathways // *Bacteriol. Rev.* 1963. Vol. 27, N 2. P. 170—181.
- Stahmann M. A., Demorest D. M., Changes in isozymes in host and pathogen following some fungal infections // *Symp. Biol. Hung.* 1972. Vol. 13. P. 355—365.
- Stahmann M. A., Clare B. G., Woodbury W. Increased diseased resistance and enzyme activity induced by ethylene and ethylene production by Black rot infected sweet potato tissue // *Plant Physiol.* 1966. Vol. 41, N 9. P. 1505—1512.
- Stein A., Loebenstein G. Induced interference by synthetic polyanions with the infection of tobacco mosaic virus // *Phytopathology.* 1972. Vol. 62, N 12. P. 1461—1466.
- Stein A., Loebenstein G. Peroxidase activity in tobacco plants with polyanion-induced interference to tobacco mosaic virus // *Ibid.* 1976. Vol. 66, N 10. P. 1192—1194.
- Stein A., Spiegel S., Loebenstein G. Studies on induced resistance to tobacco mosaic virus in Samsun NN tobacco and changes in ribosomal fractions // *Phytopathol. Ztschr.*

1985. Bd. 114, H. 4. S. 295—300.
- Steijnberg A. H., Azaiza H., Chet J.* The possible role of phenolic compounds in resistance of horticultural crops to *Dematophora necatrix* Hartig // *Ibid.* 1983. Bd. 107, H. 4. S. 318—328.
- Strickland E. H.* Circular dichroism of horseradish peroxidase and its enzyme-substrate compounds // *Biochim. et biophys. acta.* 1968. Vol. 151, N 1. P. 70—75.
- Swedin B., Theorell H.* Dioximalic acid oxidase action of peroxidase // *Nature.* 1940. Vol. 145, N 3663. P. 71—72.
- Tadors L. K., Andrei D., Motas C.* Rolul părții glucidice în degradare intracelulară a glicoproteinelor. XVII. Degradarea peroxidazei // *Stud. si cerc. biochim.* 1982. Vol. 25, N 1. P. 59—73.
- Tadors L. K., Andrei D., Motas C.* The role of carbohydrate in the intracellular degradation of glycoproteins. XIX. The involvement of specific sugar residues in the active site of peroxidase isoenzyme A // *Rev. Roum. Biochem.* 1983. Vol. 20, N 4. P. 293—300.
- Tanguy J.* Quelques aspects du métabolisme des composés phénoliques chez les *Nicotiana* hypersensibles au virus de la mosaïque du tabac souche commune (V. M. T.) // *Physiol. Veget.* 1971. Vol. 9, N 2. P. 169—187.
- Tauber A. J., Babior B. M.* O₂ and host defense: the production and fate of O₂ in neutrophils // *Phytochem. and Photobiol.* 1978. Vol. 28, N 3. P. 701—709.
- Theorell H.* Crystalline peroxidase // *Enzimologia.* 1942. Vol. 10. P. 250—252.
- Thomas E. I., Thomas M. A.* Peroxidase-catalyzed oxidation of protein sulfhydryls mediated by iodine // *Biochemistry.* 1977. Vol. 16, N 16. P. 3581—3586.
- Tripathi R. K., Verma M. V.* Phenolic compounds and polyphenol oxidase activity in relation to resistance in potato against bacterial soft rot // *Ind. J. Ehp. Biol.* 1975. Vol. 13, N 4. P. 414—416.
- Tyson H., Taylor S.A., Fieldes M. A.* Segregation of environmentally induced relative mobility shifts in flax genotroph peroxidase isozymes // *Heredity.* 1978. Vol. 40, N 2. P. 281—290.
- Ugarova N. N., Kutuzova G. D., Rogozhin V. V., Berezin A. V.* Functionally important carboxyl groups of horseradish peroxidase // *Biochim. et biophys. acta.* 1984. Vol. 790, N 1. P. 22—30.
- Uritani I., Stahmann M. A.* Changes in nitrogen metabolism in sweet potato with black rot // *Plant Physiol.* 1961. Vol. 36, N 6. P. 770—782.
- Urs N. V. R., Dunleavy J. M.* Bactericidal activity of horseradish peroxidase on *Xanthomonas phaseoli* var. *Sojensis* // *Phytopathology.* 1974. Vol. 64, N 5. P. 542—545.
- Urs N. V. R., Dunleavy J. M.* Enhancement of the bactericidal activity of a peroxidase system by phenolic compounds // *Ibid.* 1975. Vol. 65, N 6. P. 686—690.
- Urs N. V. R., Hill J. H.* Inactivation of southern bean mosaic virus by a horseradish peroxidase-hydrogen peroxidase system // *Ibid.* 1978. Vol. 91, N 2. P. 365—368.
- Vahl U., Müller G.* Elektrophoretisch getrennte Primärblatt-Peroxidasen als biochemistry Marker in Winterweizenjungpflanzen // *Biochem. und Physiol. Pflanz.* 1984. Bd. 179, H. 5. S. 401—402.
- Vance C. P., Anderson G. O., Sherwood R. T.* Soluble and cell wall peroxidases in reed canarygrass in relation to disease and localized lignin formation // *Plant Physiol.* 1976. Vol. 57, N 6. P. 920—922.
- Vance C. P., Sherwood R. T.* Regulation of lignin formation in reed canarygrass in relation to disease resistance // *Ibid.* P. 915—919.
- Vance C. P., Kirk T. K., Sherwood R. T.* Lignification as a mechanism of disease resistance // *Annu. Rev. Phytopathol.* 1980. Vol. 18, N 2. P. 259—288.
- Vandenberg B. M., Vanhuystee R. B.* Rapid isolation of plant peroxidase. Purification of peroxidase from petunia // *Physiol. plant.* 1984. Vol. 60, N 3. P. 294—304.
- Veech J. A.* Localization of peroxidase in infected tobacco susceptible and resistant to Bleak shan R. // *Phytopathology.* 1969. Vol. 59, N 5. P. 566—571.
- Vegetti G., Conti G. G., Pesci P.* Changes in phenylalanine-ammonia-lyase, peroxidase during the development

- of local necrotic lesions in pinto bean leaves infected with alfalfa mosaic virus // *Phytopathol. Ztschr.* 1975. Bd. 84, H. 2. S. 153—171.
- Venere R. J. Role peroxidase in cotton resistant to bacterial blight // *Plant Sci. Lett.* 1980. Vol. 20, N 1. P. 47—56.
- Venis M. A. Cell-free ethylene-forming systems lack stereochemical fidelity // *Planta.* 1984. Vol. 162, N 1. P. 85—88.
- Walker G. A., Kilgour G. L. Pyridine nucleotide oxidizing enzymes of *Lactobacillus casei*. 2. Oxidase and peroxidase // *Arch. Biochem.* 1965. Vol. 111, N 3. P. 534—539.
- Walton D. C. α -phenylalanine ammonia lyase activity during germination of phaseolus germination of *Phaseolus vulgaris* // *Plant Physiol.* 1968. Vol. 43, N 7. P. 1120—1125.
- Weber D. J., Stahmann M. A. Ceratocystis infection in sweet potato: its effects on protein isozymes and acquired immunity // *Science.* 1964. Vol. 146, N 3646. P. 929—931.
- Welinder K. G., Smillie L. B., Schonhaum G. R. Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. I. Tryptic peptides // *Canad. J. Biochem.* 1972. Vol. 50, N 1. P. 44—62.
- Weststeijn E. A. Peroxidase activity in leaves of *Nicotiana tabacum* var. Xanthi nc. before and after infection with tobacco with tobacco mosaic virus // *Physiol. Plant Pathol.* 1976. Vol. 8, N 1. P. 63—71.
- Weststeijn E. A. Permeability changes in the hypersensitive reaction of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. after infection with tobacco mosaic virus // *Ibid.* 1978. Vol. 13, N 2. P. 253—258.
- Weststeijn E. A. Lesion growth and virus localization in leaves of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. after inoculation with tobacco mosaic-virus and incubation alternately at 22° C and 32° C // *Ibid.* 1981. Vol. 18, N 3. P. 357—368.
- Weststeijn E. A. Evidence for a necrosis-inducing factor in tobacco mosaic virus-infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc grown at 22° C but not at 32° C // *Ibid.* 1984. Vol. 25, N 1. P. 83—91.
- White R. B. Acetylsalicylic-acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco // *Virology.* 1979. Vol. 99, N 2. P. 410—412.
- Wieringa-Brants D. H., Dekker W. C. Induced resistance in hypersensitive tobacco against tobacco mosaic virus by injection of intercellular fluid from tobacco plants with systemic acquired resistance // *Phytopathology.* 1987. Vol. 118. N 2. P. 165—170.
- Wilson J. M., Wong E. Peroxidase catalyzed oxygenation of 4,2'-trihydroxychalcone // *Phytochemistry.* 1976. Vol. 15, N 9. P. 1333—1341.
- Wood R. R. Analytical isoelectric focusing of isoperoxidases from plants infected with cucumber mosaic virus (strain W) // *Ibid.* 1971. Vol. 10. P. 2383—2384.
- Woods T. L., Agrios G. N. Inhibitory effects of a polyphenol-oxidase system on the infectivity of cowpea chlorotic mottle virus ribonucleic acid // *Phytopathology.* 1974. Vol. 64, N 1. P. 35—37.
- Yamazaki J., Piette L. H. Mechanism of aerobic oxidase reaction catalysed by peroxidase // *Biochim. et biophys. acta.* 1963. Vol. 77, N 1. P. 47—64.
- Yang S. T., Hoffman N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1984. Vol. 35. P. 155—189.
- Yu L. M., Hampton R. E. Biochemical changes in tobacco infected with *Colletotrichum destructivum* 2. Peroxidases // *Phytochemistry.* 1964. Vol. 3, N 5. P. 499—501.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
Глава 1. ПЕРОКСИДАЗА — ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЙ	7
1.1. История изучения фермента	7
1.2. Особенности строения молекулы	8
1.3. Первичная структура	10
1.4. Каталитические свойства	12
1.5. Сродство к субстратам	16
Глава 2. РОЛЬ ПЕРОКСИДАЗЫ В РАСТИТЕЛЬНОМ ОРГАНИЗМЕ	18
2.1. Физиологические функции	18
2.2. Участие пероксидазы в дыхании растений	20
2.3. Множественность молекулярных форм	22
2.4. Генетический контроль синтеза	24
2.5. Изоэнзимы — маркеры биохимических процессов	26
Глава 3. НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ ИММУННОГО ОТВЕТА	27
3.1. Принцип защитных реакций	27
3.2. Антипатогенное действие пероксидазы	30
3.3. «Патогенезозависимые» белки растений	32
3.4. Лигнин как фактор защиты клеток	33
3.5. Участие этилена в защитных реакциях	34
3.6. Вирусиндуцированная устойчивость	38
3.7. Синтез изоэнзимов <i>de novo</i>	40
Глава 4. ФЕНОЛЫ — СУБСТРАТЫ ФЕРМЕНТА ПЕРОКСИДАЗЫ	42
4.1. Общие вопросы метаболизма фенолов	42
4.2. Некрозогенез и его проявление	45
4.3. Защитные функции фенолов	47
4.4. Содержание фенолов в растениях табака	48
4.5. Бензойная кислота при заражении	52
Глава 5. ПЕРОКСИДАЗЫ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ И ДУРМАНА	54
5.1. Активность фермента при различных воздействиях	54
5.2. Повышение активности фермента при грибной и вирусной инфекциях	55
5.3. Активность пероксидазы и полифенолоксидазы в листьях картофеля, зараженного вирусом L	56
5.4. Изопероксидазы растений <i>D. stramonium</i>	61
5.5. Влияние разных штаммов ХВК на активность фермента	64
5.6. Характеристика пероксидаз, выделенных из <i>D. stramonium</i>	66
Глава 6. ПЕРОКСИДАЗЫ РАСТЕНИЙ ТАБАКА	71
6.1. Активность фермента при системном поражении	71
6.2. Активность при локальном поражении	73
6.3. Характеристика суммарных пероксидаз растений табака	74
6.4. Анионные изоэнзимы пероксидазы растений Ксантин	82
Глава 7. УЧАСТВУЕТ ЛИ ПЕРОКСИДАЗА В ЗАЩИТНОМ МЕХАНИЗМЕ?	91
7.1. Элиситеры, включающие механизм устойчивости	97
7.2. Претендент на роль элиситера-индуктора	100
7.3. Возможное участие пероксидазы в защитных реакциях растений	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	107
ЛИТЕРАТУРА	110